

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

**FAKULTA STROJNÍ
KATEDRA MATERIÁLU**

Studijní program: **MN2301 Strojní inženýrství**
Studijní obor: **2303 T 002 Strojírenská technologie**
Zaměření: **Materiálové inženýrství**

Využití plasmových procesů v biologii a lékařství

The use of plasma processes in biology and medicine

KMT – 275

Bc. Aleš PETRÁŇ

Vedoucí práce:

Ing. Marta Horáková, Ph.D.

Konzultant:

prof. RNDr. Petr Špatenka, CSc.

Počet stran: 83

Počet tabulek: 7

Počet obrázků: 58

Počet rovnic: 1

Počet grafů: 0

Počet příloh: 0

Datum: **25.05.2012**

oficiální zadání

Poděkování:

Touto cestou bych rád poděkoval především vedoucí diplomové práce Ing. Martě Horákové, Ph.D. za její cenné rady a excelentní vedení v průběhu experimentů a tvorby diplomové práce.

Také bych rád poděkoval Mgr. Ireně Šlamborové, Ph.D. za přípravu vzorků pro experiment., Ing. Pavlu Kejzlarovi a Bc. Martině Tesařové za pomoc s elektronovým mikroskopem a Přemyslu Živorovi za pomoc s plazmovou modifikací vzorků a RNDr. Zdeňku Bastlovi, CSc. za zpracování vzorků pomocí analýzy ESCA.

Děkuji také všem členům katedry KMT, především doc. Ing. Karlu Daďourkovi, CSc. za zajímavé a poutavé přednášky o materiálech a jejich vlastnostech.

Jedno z největších poděkování patří především mé rodině a přítelkyni, za jejich psychickou a celoživotní podporu ve studiu a v životě.

Anotace:

Tato diplomová práce se zabývá využitím plazmových výbojů k funkcionalizaci nanovláknenných materiálů za účelem jejich dalšího použití v lékařství a také se zabývá sterilizací povrchu nanovláken. První část experimentu je zaměřena na funkcionalizaci povrchu nanovláken pomocí mikrovlnného plazmového výboje za účelem pozdějšího navázání léčiv pro jejich řízené uvolňování. Ověření navázání funkčních skupin bylo provedeno analýzou ESCA. V druhé části experimentu byl povrch nanovláken sterilizován od bakterií *E. coli* a *S. aureus* opět pomocí mikrovlnného plazmového výboje. Ověření sterilizace mikroorganismů bylo provedeno podle příslušných norem AATCC.

Klíčová slova: plazma, povrchové úpravy, funkcionalizace, sterilizace, nanovláknna

Anotation:

This thesis deals with the use of plasma discharges in a functionalization of nanofiber materials for their further use in medicine and also engaged in sterilizing the surface of nanofibers. The first part of the experiment is focused on the surface functionalization of nanofibres using microwave plasma discharge in order to later establish their drugs for controlled release. Verification of the establishment of functional groups was carried out ESCA analysis. In the second part of the experiment surface of nanofibers were sterilized from bacteria *E. coli* and *S. aureus*, again using microwave plasma discharge. Validation of sterilization of microorganisms was done according to the AATCC standards.

Keywords: plasma, surface treatment, fuctionalization, sterilization, nanofibers

Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Diplomovou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím diplomové práce a konzultantem.

Datum

Podpis



Obsah

1	Seznam použitých zkratk a symbolů	10
2	Úvod	12
3	Teoretická část	14
3.1	Využití plazmových výbojů	14
3.2	Teorie plazmových výbojů.....	14
3.3	Typy a možnosti plazmových výbojů	17
3.3.1	Mikrovlnný (MW) výboj	17
3.4	Funkcionalizace povrchu materiálů	19
3.4.1	Chemická funkcionalizace	19
3.4.2	Funkcionalizace povrchové vrstvy materiálu s využitím plazmového výboje	20
3.5	Sterilizace	22
3.5.1	Chemická sterilizace	22
3.5.2	Fyzikální sterilizace	23
3.5.3	Sterilizace plazmou	24
3.6	Nanovláknenné materiály.....	26
3.6.1	Nanovláknna z biopolymerů	28
3.6.2	Nanovláknna ze syntetických biopolymerů	28
3.6.3	Nanovláknna z anorganických materiálů.....	28
3.6.4	Nanovláknna z organických polymerů	29
3.7	Bakterie pro sterilizační proces	29
3.7.1	<i>Escherichia Coli</i>	29
3.7.2	<i>Staphylococcus Aureus</i>	30
4	Experimentální část.....	32
4.1	Výběr nanovláknenných materiálů	32
4.2	MW plazmový vakuový systém.....	35
4.3	Funkcionalizace nanovláknenných materiálů	37
4.3.1	Optimalizace procesních parametrů.....	37



4.3.2	Funkcionalizace nanovláknenných materiálů PVA a PCL.....	41
4.3.3	Analýza SEM.....	44
4.3.4	Analýza ESCA (XPS).....	49
4.4	Diskuze výsledků funkcionalizace nanovláknenných materiálů.....	61
4.5	Sterilizace nanovláknenných materiálů.....	65
4.5.1	Příprava vzorků pro sterilizaci.....	65
4.5.2	Optimalizace procesních parametrů sterilizace	66
4.5.3	Testy sterilizace	67
4.5.4	Sterilizace nanovláken PVA – výsledky.....	68
4.5.5	Sterilizace nanovláken SiO ₂	70
4.6	Diskuze výsledků sterilizace	74
5	Závěr	77
6	Seznam použité literatury	78



1 Seznam použitých zkratk a symbolů

Te	– teplota elektronů	[K]
Ti	– teplota iontů	[K]
To	– teplota neutrálních částic	[K]
ω	– budicí frekvence	[Hz]
ω_{cc}	– elektronová cyklotronová frekvence	[Hz]
e	– náboj elektronu	[C]
B	– magnetická indukce	[T]
m_e	– hmotnost elektronu	[kg]
ECR	– elektronová cyklotronová rezonance	
MW	– mikrovlnny	
H ₂	– vodík	
O ₂	– kyslík	
H ₂ O	– voda	
H ₂ O ₂	– peroxid vodíku	
He	– helium	
Ar	– argon	
Ag	– stříbro	
CO	– oxid uhelnatý	
CO ₂	– oxid uhličitý	
N ₂	– dusík	
NaCl	– chlorid sodný	
NH ₃	– amoniak	
C ₂ H ₄	– etylén	
EtO	– ethylenoxid	
⁶⁰ Co	– nestabilní radioizotop kobaltu	
UV záření	– ultrafialové záření	
NH ₂	– aminové funkční skupiny	
(-OH)	– hydroxylové funkční skupiny	
(-COOH)	– karboxylové funkční skupiny	
(-C=O)	– karbonylové funkční skupiny	



(-CHO)	– aldehydové funkční skupiny	
(-CO-O)	– esterové funkční skupiny	
(H-O-O·)	– peroxidové funkční skupiny	
PLA	– kyselina polymléčná	
PGA	– kyselina polyglykolová	
PCL	– polykaprolakton	
TiO ₂	– oxid titaničitý	
SiO ₂	– oxid křemičitý	
Al ₂ O ₃	– oxid hlinitý	
ZrO ₂	– oxid zirkončitý	
Li ₄ Ti ₅ O ₁₂	– titaničitan litný	
PVK	– polyvinylkarbazol	
PMMA	– polymethylmethakrylát	
PU	– polyuretan	
PC	– polykarbonát	
PS	– polystyrén	
PA	– polyamid	
CA	– acetát celulosy	
PBI	– polybenzenimid	
PEVA	– polyethylenvinylacetat	
PEO	– polyethylenoxid	
PVF	– polyvinylfluorid	
PVP	– polyvinylpyrrolidon	
PLGA	– polylaktid-co-glykolid	
PVA	– polyvinylalkohol	
E. coli	– Escherichia coli – bakterie	
S. aureus	– Staphylococcus aureus – bakterie	
CFU/ml	– jednotky tvořící kolonie na 1 ml	[-]
SEM	– skenovací elektronový mikroskop	
ESCA	– elektronová spektroskopie pro chemickou analýzu	
E _B	– vazebná energie	[eV]
AATCC	– antibakteriální aktivita, posouzení textilních materiálů	
C ₂ H ₃ COOH	– kyselina akrylová	



2 Úvod

V současné době dochází k prudkému rozvoji nových fyzikálních technologií povrchových úprav materiálů, a to konkrétně technologií využívajících nízkoteplotní plazmový výboj [1].

Intenzivní výzkum v oblasti nízkoteplotních výbojů přináší nové základní poznatky, které umožňují např. měnit vlastnosti povrchů v určitém směru nebo vytvářet vrstvy a povlaky nových a přesně definovaných vlastností. Umožňují také vyvíjet nové a dokonalejší technologické postupy povrchové úpravy materiálu [1]. Využití nízkoteplotního plazmového výboje přináší i mnoho výhod jako možnost modifikace termolabilních materiálů – např. polymerů.

Ať už jde o aplikace nízkoteplotních plazmových výbojů v průmyslu - elektronice, vakuové technice, optice, laserové a supravodičové technice, nebo ve strojírenství, automobilovém, leteckém, kosmickém, chemickém a textilním průmyslu, lze také nízkoteplotní plazmový výboj použít v odvětví biologie a lékařství [2].

V biologii se jedná především o sterilizaci bakterií pomocí nízkoteplotního plazmatu, která je vzhledem k obecně rozšířeným základním způsobům rychlejší, účinnější, levnější a bezpečnější než např. sterilizace pomocí toxických a chemických činidel, nebo sterilizace pomocí nákladného ohřívání vodní páry [3]. V lékařství jde především o možnost využití funkcionalizace povrchu materiálu – neboli navázání funkčních skupin na povrch materiálu za účelem navázání léčiv a jejich řízeného uvolňování v lékařských zařízeních a kompozitech jako jsou např. obvazy, náplasti, implantáty, umělé cévy atd.

Cílem této diplomové práce je zjistit využitelnost plazmových výbojů v biologii a lékařství. Podstatou celé studie je pokus o navázání funkčních skupin (funkcionalizaci) na povrch nanovlákného materiálu za účelem pozdějšího navázání léčiv pro jejich řízené uvolňování. Jedná se tedy o počáteční fázi vývoje nového materiálu, který by měl být v přímém kontaktu s lidským tělem a měl by mít léčivé účinky. Vzhledem k následnému použití tohoto materiálu je zapotřebí, aby byl biokompatibilní, biodegradabilní a dokonale sterilní.

Využití plazmového výboje má veliký potenciál v dosažení potřebných požadavků, protože v jednom procesu lze na materiál navázat potřebné funkční skupiny a zároveň jej lze i sterilizovat.



Pro tyto požadavky byla v diplomové práci modifikována biokompatibilní a biodegradabilní polymerní organická nanovlákna z PVA (polyvinylalkohol) a PCL (polykaprolakton). Významnými vlastnostmi těchto nanovláken je především velký specifický měrný povrch a vysoká poréznost. Do budoucna se očekává, že porézní nanovlákna budou ideálním kandidátem v řadě aplikací, jako je filtrace, tkáňové inženýrství a řízené dávkování léčiv [4]. Pro porovnání výsledků byla testována i nanovlákna anorganická z SiO_2 (oxid křemičitý).

V teoretické části diplomové práce jsou popsány typy funkcionalizace povrchu pomocí plazmových výbojů, způsob sterilizace pomocí plazmového výboje a typy nanovláknenných materiálů. V první části experimentu diplomové práce jsou popsány parametry funkcionalizace na nanovláknenných materiálech a jejich výsledné zhodnocení podle analýzy ESCA a SEM. V další části experimentu je zjišťována přítomnost bakteriálních kolonií po procesu sterilizace podle příslušné normy AATCC.



3 Teoretická část

3.1 Využití plazmových výbojů

Použití plazmových výbojů v praxi nachází v dnešní době stále větší spektrum uplatnění. Využití plazmových výbojů se týká především povrchu materiálu a jeho úprav – modifikace, leptání, depozice tenkých vrstev, změny povrchové energie a další. U určitých typů plazmových výbojů je teplota srovnatelná s pokojovou, takže pro modifikace lze využívat i materiály citlivé na vyšší teploty, jako jsou třeba plasty. Nevýhodou těchto technologií je potřeba zařízení pro vytvoření vakua, což vede ke zvýšení nákladů a celkové zpomalení výrobního procesu. Tento nedostatek odpadá u nízkoteplotních plazmových výbojů vytvářených za atmosférického tlaku [1].

3.2 Teorie plazmových výbojů

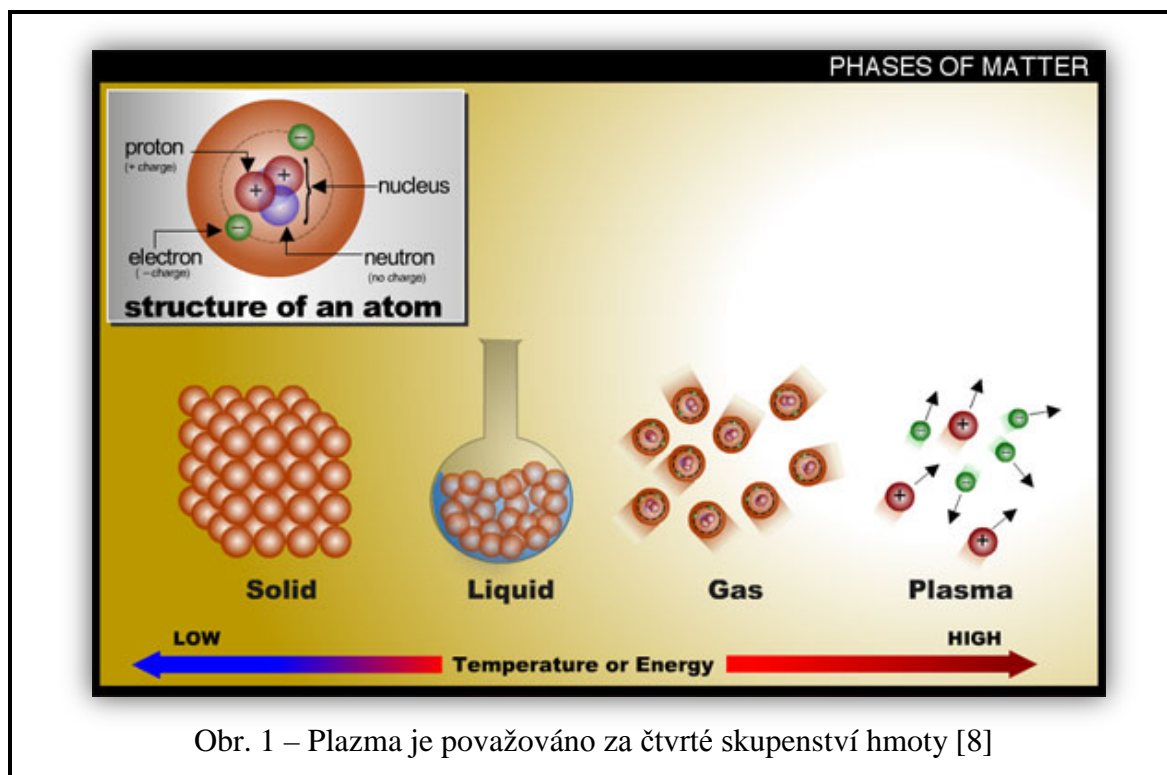
Atom se elementárně skládá z jádra (které obsahuje pozitivně nabitě protony a jeden neutron, který nemá žádný náboj), které obklopují negativně nabitě elektrony v párech, které jsou organizovány na různých drahách (orbitalech) závislých na jejich energetických hladinách. V tomto skupenství je každý atom vyvážen s celkovým neutrálním nábojem vzniklým za pomoci stejného počtu elektronů a protonů. Jak se energie dále přidává atomům nebo molekulám daného plynu, začnou vznikat pozitivní ionty a volné, negativně nabitě elektrony (viz obr. č. 1). V různých případech reagují elektrony s jinými atomy a tím vznikají záporně nabitě ionty [5].

Plazma je tedy ionizovaný plyn složený z iontů, elektronů (a případně neutrálních atomů a molekul), který vzniká odtržením elektronů z elektronového obalu atomů plynu, či roztržením molekul (ionizací). K vytvoření plazmatu je potřeba, aby se z atomů nebo molekul v plynné fázi uvolnily elektrony nebo došlo k ionizaci. Ionizace vzniká, pokud atom nebo molekula získá dostatečné množství energie – může ji přijmout z vnějšího zdroje, ale také díky vzájemným srážkám se sousedními částicemi. Ke generaci a udržení plazmatu je potřebný zdroj energie způsobující ionizaci [6]. Plazma je považováno za 4. skupenství hmoty, je kvazineutrální (tj. v makroskopickém objemu je stejné množství kladných i záporných nábojů) a vykazuje kolektivní chování – jako celek reaguje na elektrické a magnetické pole [7].



V současné době se používají dvě základní uspořádání – umístění výrobku mimo prostor výboje nebo umístění výrobku v oblasti výboje. Při umístění výrobku mimo prostor výboje je dopadání aktivních částic zajištěno prouděním plynu skrz výboj [1].

Mohou vznikat různé typy plazmatu, které jsou pojmenovány většinou podle plynu, ze kterého se vytváří, např. kyslíkové nebo neonové plazma. Bylo použito mnoho plynů pro vytvoření plazmatu jako kyslík, peroxid vodíku, kyselina peroctová, aldehydy (jako formaldehydy) a halogeny. Jak již bylo zmíněno dříve, k vyrobení plazmatu je zapotřebí dodávat plynu energii v podobě tepla nebo elektromagnetického záření. Za normálního (atmosférického) tlaku je potřeba dodávat teplo nad teplotu 3000°C, aby došlo ke vzniku plazmového výboje [5].



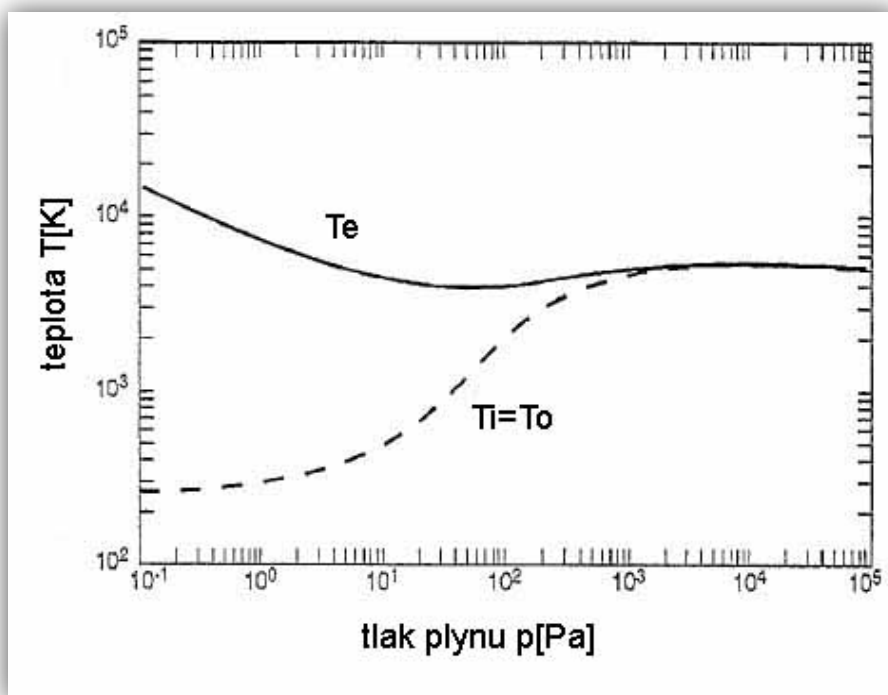
Obr. 1 – Plazma je považováno za čtvrté skupenství hmoty [8]

Podstatné však je, aby v průběhu plazmového zpracování nedošlo k tepelnému ovlivnění povrchu nebo dokonce k jeho destrukci. Je tedy zapotřebí zajistit nízkou teplotu výboje. Teplotu výboje lze ovlivnit např. chlazenými elektrodami. Avšak podstatou samotného principu nízkoteplotního výboje je termodynamická nerovnováha, kdy teplota iontů a neutrálních částic je velmi nízká v porovnání s teplotou elektronů. Tato podmínka je uskutečnitelná za nižších tlaků (od 10³ Pa a níže), viz obr. č. 2 [1].

Lehké částice, jako jsou elektrony, získají v elektrickém poli mnohem větší energii, než těžké částice jako jsou ionty. Neutrální částice zůstanou neovlivněny. Nejvyšší



množství energie získají těžké částice srážkami s elektrony. Jeden elektron pro ztrátu své energie uskuteční několik srážek. Při nízkém tlaku je počet srážek elektronů a těžkých částic poměrně nižší [1]. Elektrony tedy nepředají tepelnou energii těžkým částicím a budou mít rozdílné teploty – vznikne *nerovnovážné plazma* [7]. Při stoupajícím tlaku se počet srážek zvyšuje a s ním úměrně roste teplota. Avšak aby plazma mohlo dosáhnout termodynamické rovnováhy, musí mít dostatek prostoru a času na stabilizaci. Příkladem pro termodynamicky rovnovážný výboj lze uvést např. blesk nebo elektrický oblouk [1].



Obr. 2 – Závislost teploty elektronů T_e , iontů T_i a neutrálních částic T_o na tlaku [1].

Existuje několik základních způsobů, jak udržet počet srážek elektronů s těžkými částicemi na nízké úrovni a tím i termodynamickou nerovnováhu. První způsob je použití nízkého tlaku (1 – 150 Pa). Druhým způsobem je lokalizace výboje do malého prostoru. Tímto způsobem lze docílit poměrně nízkého počtu srážek elektronů a těžkých částic i za atmosférického tlaku. Třetím způsobem je omezení doby výboje na kratší čas, za kterého nestihne dojít ke stabilizaci a termodynamické rovnováze [1].



Vlastnosti plazmatu se také odvíjí od použitého typu zdroje. Plazma lze generovat stejnosměrným nebo střídavým proudem, vysokofrekvenčními (1-300 MHz), mikrovlnnými (300 MHz – 100 GHz) a optickými zdroji [9].

Pokud budou podmínky vhodně zvoleny (aparatura, tlak, plyn, testovaný materiál), je možné při interakci nerovnovážného plazmatu s povrchem dosáhnout požadovaných změn vlastností povrchu, přičemž se nezmění prakticky objemové vlastnosti materiálu [10].

3.3 Typy a možnosti plazmových výbojů

Plazmové výboje můžeme jednoduše rozdělit podle tlaku, ve kterém vznikají – na nízkotlaké a atmosférické. Mezi nízkotlaké plazmové výboje patří stejnosměrný (DC) výboj, radiofrekvenční (RF) výboj. V této diplomové práci se však zaměříme na použití pouze mikrovlnného (MW) výboje. V atmosférickém tlaku může vznikat korónový výboj nebo dielektrický bariérový výboj, který dále můžeme dělit na atmosférický doutnavý výboj nebo na filamentární dielektrický bariérový výboj [1].

3.3.1 Mikrovlnný (MW) výboj

Za použití zdroje s vysokými budícími frekvencemi (300 MHz – 100 GHz) je výboj ve stavu, kdy srážková frekvence elektronů s neutrálními částicemi je nižší než frekvence budícího elektromagnetického pole [1]. Používá se tzv. ECR (electron cyclotron resonance) princip výboje. Vznik plazmatu je založen na srážkách elektronů s neutrálními částicemi plynu. Aby však mohlo dojít k ionizaci neutrálních částic plynu, musí mít elektrony dostatečnou energii. Kombinací magnetického pole a mikrovlnného záření je za podmínek ECR možné velmi účinně předávat elektronům energii z mikrovlnného zdroje.

V magnetickém poli vykonává elektron kruhový pohyb kolmo na směr magnetických siločar s frekvencí úměrnou indukci magnetického pole. Pokud se tato frekvence rovná frekvenci zdroje elektromagnetického záření, dochází za vhodných geometrických podmínek k rezonanci kruhového pohybu elektronu v magnetickém poli s frekvencí kmitání elektrického vektoru mikrovlnného záření. V průběhu jedné otáčky

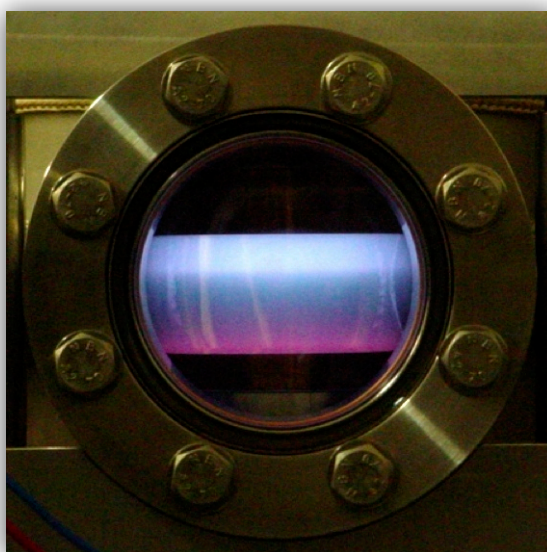


elektronu dochází odpuzováním a přitahováním elektrickým polem mikrovlnného záření k nárůstu kinetické energie elektronu [11].

V praxi se využívá frekvence zdroje 2,45 GHz, kterému odpovídá magnetické pole o intenzitě 0,0875 [T] pro splnění podmínek ECR. Pokud je dráha elektronu před srážkou dostatečně dlouhá (za nízkých tlaků), dokáže elektron vykonat mnoho otáček a tím získá značnou energii potřebnou k ionizaci atomů při následné srážce [11]. Požaduje se tedy, aby budící frekvence ω byla v rezonanci s elektronovou cyklotronovou frekvencí ω_{cc} , která je definována vztahem:

$$\omega_{cc} = \frac{e \times B}{m_e} \quad (1)$$

kde e je náboj elektronu, B je velikost magnetické indukce [T] a m_e je hmotnost elektronu. Tato podmínka je však ve skutečnosti splněna pouze v malém prostoru nebo na povrchové vrstvě, kde vektor magnetické indukce je kolmý na vektor elektrického pole. Mikrovlnný plazmový výboj (viz obr. č. 3) má tedy větší koncentraci vysokoenergetických elektronů, což má za následek větší ionizační a excitační efektivitu tohoto druhu výboje. To zároveň ale znamená vyšší teplotu výboje. Proto se tento druh plazmového výboje používá z větší části v nepřímém uspořádání, kde aktivní účinek dopadajících částic zajišťuje proudění použitého plynu [1].



Obr. 3 – Mikrovlnný plazmový výboj helia ve vakuu [12]



3.4 Funkcionalizace povrchu materiálů

Jedním z cílů diplomové práce je navázání funkčních skupin na povrch testovaného materiálu. Tato technika nachází vyšší uplatnění v různých průmyslových, ale i medicínských aplikacích. Je totiž možné upravovat velké množství povrchových vlastností: *smáčivost, adhezi, barvitelnost, index lomu, tvrdost, chemickou odolnost, tření a biokompatibilitu*. Úprava plazmatem je vhodná např. pro povrchy, které musí být kompatibilní s krevní plazmou – cévní štěpy, katétry, stenty, srdeční záklopký, membrány (pro hemodialýzu) a filtry (např. na třídění krevních buněk) [6].

Obecně lze povrchové úpravy materiálů rozdělit na fyzikální a chemické. Fyzikální úpravy často využívají vysoce energetické částice nebo záření způsobující změnu chemické struktury a mikrostruktury materiálu. Fyzikální úpravy lze aplikovat na všechny typy materiálů – kovy, skla, keramiky, polymery a kompozity. Nezáleží také na tvaru výrobku. Důležitý je však výběr vhodné techniky povrchové úpravy a jejich technologických parametrů pro účel funkcionizace povrchu daného materiálu [13].

3.4.1 Chemická funkcionizace

Mezi chemickou funkcionizací povrchu lze řadit např. oxidaci a fluoraci. Oxidace se provádí vystavením materiálu ve vodném roztoku kyselinám (koncentrované kyselině dusičné nebo směsi kyseliny dusičné a sírové) nebo H_2O_2 . Pro zvýšení účinnosti lze použít ultrazvuku nebo mikrovlnného zdroje. Vznikají funkční skupiny jako $-COOH$, $-C=O$ a $-OH$. Tato funkcionizace se používá pro systémy s řízením dodáváním léčiv [14]. U fluorace dochází k nahrazování vodíkových atomů atomy fluoru. Proces probíhá ve vakuu. Konkrétně u polymerů lze díky této funkcionizaci zvýšit adhezi, smáčivost a tím pádem barvitelnost a potiskovatelnost [15].



3.4.2 Funkcionalizace povrchové vrstvy materiálu s využitím plazmového výboje

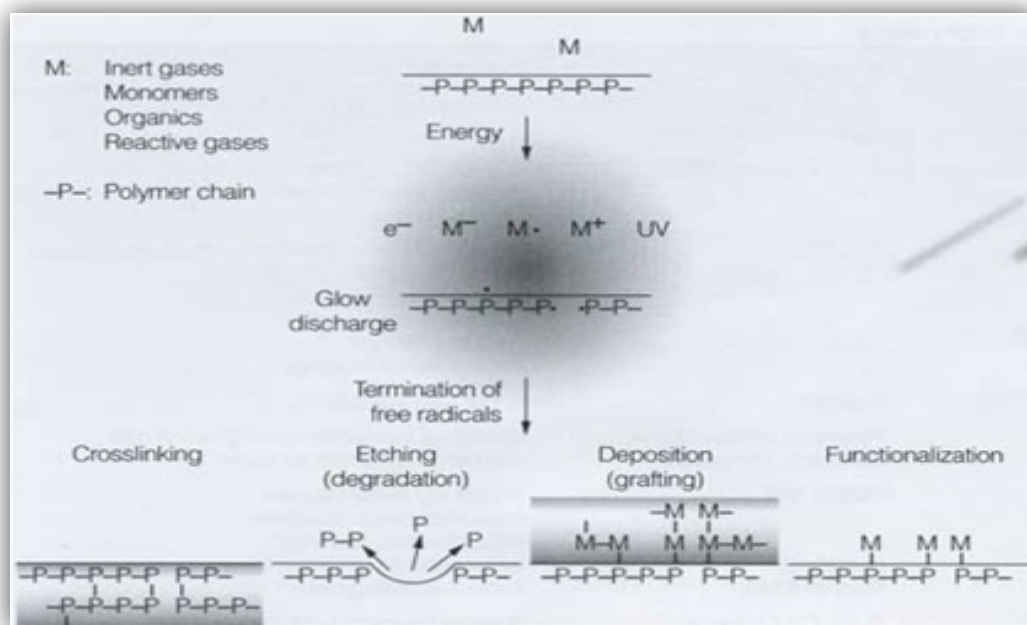
Plazmové zpracování probíhá tak, že se vytváří aktivní částice – ionty, excitované atomy atd. – průchodem plynu plazmovým výbojem. Tyto částice mohou ulpívat na povrchu výrobku a vytvářet vrstvy, vyvolávat chemické reakce nebo se jich aktivně zúčastnit. Díky plazmovým výbojům lze také povrch výrobku čistit od tuků, mastných kyselin a prachu [6].

Funkcionalizace povrchu materiálu může být v zásadě prováděna třemi typy plazmových procesů – depozicí, plazmovou povrchovou modifikací a plazmovým leptáním. Plazmová depozice je např. polymerizace, která zahrnuje fragmentaci a následnou depozici organických monomerů. Plazmové leptání, které ovlivňuje především topografii zpracovávaného povrchu, vzniká důsledkem iontového bombardu povrchu materiálu a radiací UV zářením vznikajícím v plazmě. Proces leptání může probíhat současně s procesem polymerizace [6, 13, 16].

Funkcionalizace plazmovou povrchovou modifikací spočívá především v oxidaci povrchu generováním funkčních skupin, např. hydroxylových (-OH), karboxylových (-COOH), aldehydových (-CHO), karbonylových (-C=O), esterových (-CO-O) a peroxidových (H-O-O·) [17].

Proces oxidace je ovlivněn typem použitého pracovního plynu. Nejčastějšími plyny jsou O₂, He, CO₂, N₂, NH₃ a vzduch (ve zvláštních případech se používá Ar). Podle typu plazmového plynu dochází k navázání různých funkčních skupin. [6,10,13,16,17].

Jak bylo uvedeno výše, pro funkcionalizaci povrchů materiálů lze provádět prostřednictvím celé řady chemických funkčních skupin. S ohledem na požadované povrchové vlastnosti nanovlákených materiálů byly zvoleny chemické funkční skupiny hydroxylové (-OH), karboxylové (-COOH) a aminové (NH₂) – proto v následujících kapitolách diplomové práce bude uveden podrobnější popis funkcionalizace s cílem získání těchto funkčních skupin.



Obr. 4 - Princip funkcionizace povrchu materiálu plazmatem [10]

Hydroxylové funkční skupiny (-OH)

Funkcionizaci povrchu materiálu pomocí generování -OH skupin lze docílit pomocí plazmové povrchové modifikace nebo plazmovou polymerizací. Při tomto procesu lze využít celou řadu pracovních plynů a chemických látek (resp. jejich par). Příkladem může být zpracování v O_2 nebo ve vzduchu. Tyto procesy jsou již používány v průmyslu při povrchové hydrofilizaci polymerů. Další možností jsou kombinace O_2 a H_2O , nebo chemikálie propargylalkohol, alylalkohol, propanol, izopropylalkohol, etanol, metanol a další, kdy bývá často pracovním plynem Ar [18 - 23].

Karboxylové funkční skupiny (-COOH)

Pro vytvoření karboxylových funkčních skupin je nejčastěji využíváno plazmového zpracování v CO nebo CO_2 atmosféře. Často se také využívá kombinace Ar s parami kyseliny akrylové. Další možností jsou kyselina propargylová nebo kyselina propionová. I v tomto případě se nejčastěji využívá plazmové modifikace nebo plazmové polymerizace [24 - 29].



Aminové funkční skupiny (-NH₂)

Pro získání aminových funkčních skupin se nejčastěji využívá plazmové modifikace s amoniakem nebo plazmové polymerizace alylaminových monomerů. V oblasti funkcionalizace povrchu NH₂ skupinami se také používají různé pracovní směsi s amoniakem, např. NH₃ a H₂, NH₃ a C₂H₄, nebo samotný N₂ [16, 30 - 31].

3.5 Sterilizace

Sterilizace je definovaný proces k získání povrchů nebo výrobků kompletně bez živých organismů včetně bakteriálních spor. Způsoby sterilizace můžeme rozdělit podle použitých sterilizačních činidel - fyzikální, chemické – nebo jejich kombinace. Sterilizační proces by měl působit efektivně proti mikroorganismům včetně bakterií, mykobakterií, virům, houbám, prvkům a bakteriálním sporům [5]. V této diplomové práci se budeme zabývat sterilizací bakterií *Escherichia Coli* a *Staphylococcus Aureus* s využitím MW plazmového výboje.

3.5.1 Chemická sterilizace

Ethylenoxid

Sterilizační proces probíhá při teplotách do 55°C při mírně zvýšeném tlaku a vlhkosti. Lze ji proto použít na termolabilní materiály [32]. EtO je vysoce toxická, karcinogenní a mutagenní látka, jejíž páry ve směsi se vzduchem vybuchují. Po sterilizaci je nutno prostory odvětrávat poměrně dlouhou dobu [9].

Formaldehyd

Působí ve směsi s parami H₂O a to při teplotě 60 – 80°C za určitého podtlaku v komoře. Poté se komora zavzdušňuje přes antibakteriální filtr [9]. Mechanismus účinku je založen na redukčních vlastnostech – formaldehyd reaguje se skupinami -NH₂ a -OH v bílkovinách a nukleových kyselinách a tím inaktivuje enzymy v mikrobiálních buňkách [32].



3.5.2 Fyzikální sterilizace

Sterilizace párou

Aplikace vysokoteplotní páry je nejčastěji a široce používaná jako sterilizační metoda [5]. Představuje velmi účinný a ekonomicky výhodný sterilizační postup [32]. Sterilizační proces lze nastavit pouze s ohledem na sterilizovaný materiál (aby nedošlo k jeho poškození). Rozsah nastavení sterilizačních teplot závisí na velikosti tlaku v nádobě (při tlaku 0,3 MPa odpovídá teplota vodní páry 140°C) [9].

Sterilizace párou se provádí v “*autoklávech*” [32], což jsou uzavíratelné tlakové nádoby pro reakce probíhající za vysokých tlaků a teplot. Účinné odstranění vzduchu je nezbytné pro sterilizaci, protože vzduch brání penetraci páry a zanechává chladná místa v komoře. To může způsobit, že dávka nebude dostatečně sterilizována [5].

Sterilizace horkým vzduchem

Aplikuje se pouze na materiály odolné teple. Probíhá v horkovzdušných stabilizátorech, přičemž obvyklé doby sterilizačního procesu závisí na zvolené teplotě: 60 min pro 160°C, 30 min pro 170°C, 20 min pro 180°C. Metoda je vhodná pro tuky, vosky a prášky neobsahující vodu. Kovy nebo papír mění své vlastnosti – nejsou vhodné [9].

Sterilizace pomocí UV záření

Jedná se teoreticky i experimentálně o velmi účinnou metodu, v praxi má však velké omezení – neproniká do hloubky. Sterilizace se provádí pomocí germicidních zářičů, které ale mají nízkou životnost. Metoda je vhodná pro rychlou sterilizaci čistých ploch, např. v pracovních boxech [9].



Sterilizace pomocí ionizačního záření

Provádí se v ozařovacích centrech. Používá se pronikavé gama záření – např. radioizotopu ^{60}Co v minimální dávce 25 kGy [32]. Velikou výhodou je, že proniká jak obaly, tak sterilizovaným materiálem. Záření se dostane i k zabaleným předmětům [9]. Další výhodou je, že tento proces není závislý na teplotě, tlaku, vlhkosti a jiných faktorech [32].

3.5.3 Sterilizace plazmou

V plazmovém výboji mohou vznikat nestabilní částice, jako např. ozón – O_3 (v případě kyslíkových plazem) a další volné radikály. Ostatní volné radikály, které se vytvoří, obsahují hydroxylový radikál ($\cdot\text{-OH}$) [5].

Tyto radikály jsou vysoce reaktivní, protože mají nespárované elektrony v nejvyšších orbitalech. Způsobují v kontaktu s atomy a molekulami ubírání nebo přidávání elektronu. Proto při vystavení mikroorganismů těmto radikálům dochází k různým efektům, které způsobují strukturní a funkční poškození komponentům buněk včetně proteinů, lipidů a nukleových kyselin. To vede ke smrti buněk. Dále, když se excitované elektrony vracejí do svých přirozených stavů (klesají v hladinách), dochází k uvolnění energie ve formě tepla nebo fotonů, např. UV záření o vlnové délce 100 až 350 nm. To také přispívá k antimikrobiální aktivitě. Když je energetický zdroj, který napájí plyn vypnut, různé částice se velmi rychle ustálí na úrovni s nižší energií a získají opět stabilní formu [5].

V některých případech je plazma vyrobeno pomocí plynu v dané komoře (například peroxid vodíku), zatímco v ostatních může být vyrobeno v separované komoře a teprve poté přivedeno do sterilizační komory. Plazma bylo také popsáno pro výrobu ozónu a dalších reaktivních částic z kyslíku, které mohou být aplikovány povrchům různých materiálů [5].

Celkově se dá říct, že různé druhy plazmatu způsobují antimikrobiální aktivitu díky produktivitě mnoha reaktivních částic – volných radikálů, nabitých částic atd. Ovšem i přesto je potřeba využívat delší časy vystavení vzorků, protože bakteriální spory (částečně aerobní spory včetně bacilů a geobacilů) vykazují největší rezistenci a odolnost vůči reaktivním částicím. Účinnost plazmatu proti mikrobům tedy závisí na

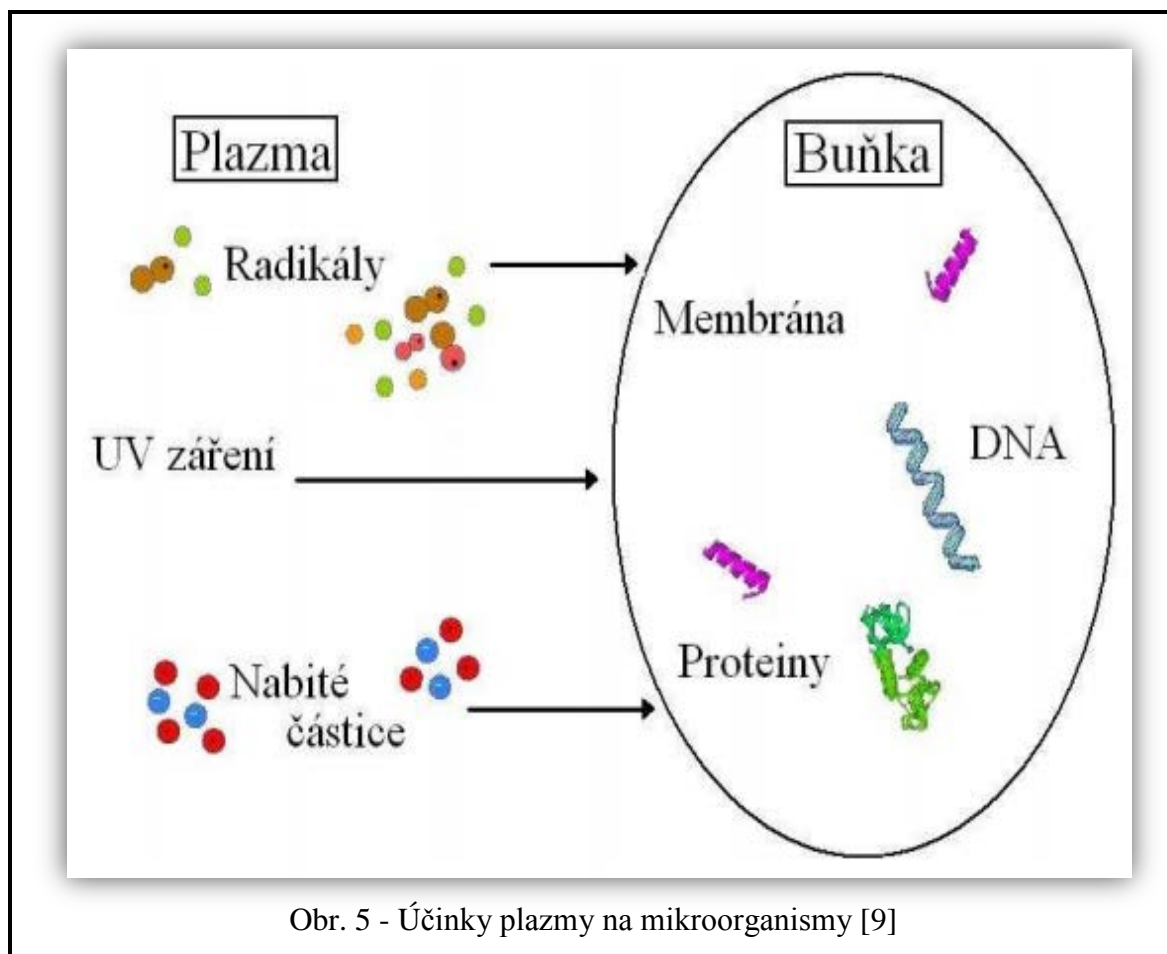


velikosti vakua, použitím plynu, který vytváří plazma a na budícím zdroji. Plazma podle svého typu může pozitivně ale i negativně ovlivnit různé kovové a plastové povrchy [5].

Mechanismy účinků plasm:

Byly zdokumentovány letální účinky plazmatu na žijící mikroorganismy, avšak přesné mechanismy, jakými plazma působí, nejsou dosud přesně definovány [9]. Mechanismy účinků všech reaktivních částic, které jsou v plazmatu, působí vzájemně v synergickém efektu [12].

Plazma působí na mikroorganismy zejména UV zářením, volnými radikály a jinými reaktivními částicemi, nabitými ionty nebo teplotou viz obr. 5. Je navržena celá řada mechanismů, kterými může na buňky působit – tvorba pórů, leptání, změna náboje, degradace buněčných struktur, přímým bombardováním buněčného povrchu, oxidací sloučenin nebo fotodesorpce [9].



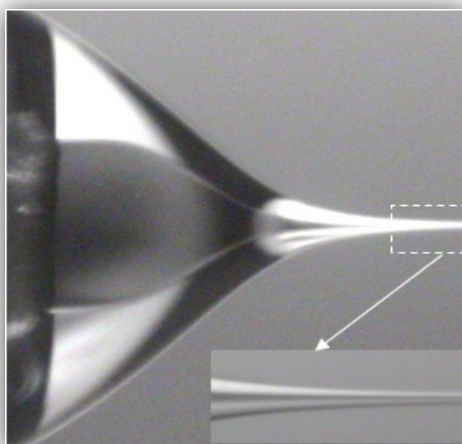
Obr. 5 - Účinky plazmy na mikroorganismy [9]



Celková intenzita jednotlivých složek se mění v závislosti na vzdálenosti od výboje, nosném plynu a jeho chemickém složení, spektru záření, tvorbě volných radikálů a teplotě. Podstatné je uložení vzorku – zda je přímo ve výboji a působí na něj všechny účinné složky nebo jestli je uložen nepřímo [1], protože pokud je vzdálenost vyšší, intenzita UV záření klesá a nabitě částice se neuplatní, protože se vzájemně rekombinují. V případě nepřímého uložení by vzorek ovlivňovaly hlavně volné radikály. Sterilizace v nepřímém uložení vzorku trvá déle, ale přináší i výhody jako nižší tepelné ovlivňování vzorku a menší nebezpečí chemických změn povrchů v důsledku interakce s nabitými částicemi a také možnost působit na větší objem vzorku (dáno velikostí soustavy) [9].

3.6 Nanovláknenné materiály

Podstatou výroby nanovláken (vláken o průměru do 1000 nm) je tzv. elektrostatické zvlákňování neboli electrospinning. Je to způsob přípravy ultra jemných vláken z polymerního roztoku nebo polymerní taveniny pomocí elektrostatických sil [33]. Pomocí kapilární trysky je polymerní roztok (který je připojen na vysoké napětí) zvlákňován. Avšak díky vysokému elektrickému napětí mezi špičkou kapiláry a uzemněným kolektorem vzniká tzv. Taylorův kužel (viz obr. č. 6), který je následkem relaxace indukovaného náboje k volnému povrchu kapaliny na výstupu ze zvlákňovací trysky. Z Taylorova kuželu jsou produkována submikrónová vlákna. Po odpaření rozpouštědla vlákna ztuhnou a vytvoří vláknennou vrstvu na povrchu kolektoru [34].



Obr. 6 – Taylorův kužel [35]



Nanospider je způsob přípravy nanovláken, který byl vyvinut na Katedře netkaných textilií Technické univerzity v Liberci prof. Oldřichem Jirsákem. Jeho hlavní princip spočívá v poznatku, že Taylorovy kužely je možné vytvořit i na tenké vrstvě polymerního roztoku. Metoda tedy nevyužívá k formování vláken žádné trysky a kapiláry a její produktivita je vyšší než produktivita jiných metod viz obr. č. 7 [33].



Obr. 7 – Elektrostatické zvlákňování – metoda Nanospider [36]

Častěji jsou však zvlákňovány polymery ve formě roztoku, protože vyšší viskozita polymerních tavenin nedovoluje utváření jemných vláken. Touto metodou byly již zvlákňeny různé druhy polymerů přírodních i syntetických [33]. Velmi jemná vlákna s průměrem řádově v nanometrech se vyznačují několika vynikajícími vlastnostmi - *velký specifický měrný povrch, malá velikost pórů (vyšší prodyšnost), široké spektrum polymerů vhodných ke zvlákňování, možnost aditiv a vysoká porozita* [37]. Látky pro elektrostatické zvlákňování metodou Nanospider mohou být organické polymery, biopolymery a anorganické materiály [38]. U všech nanovláknenných materiálů při výrobě závisí na typu použitých rozpouštědel, protože ta ovlivňují výsledné vlastnosti nanovláken [37].



3.6.1 Nanovlákná z biopolymerů

Kolagen je fibrilární bílkovina tvořící pojivovou tkáň např. v chrupavkách, šlachách, kostech a kůži. Jsou nerozpustné a mají vynikající mechanické vlastnosti. Želatina – perspektiva v regenerativní medicíně, vyrábí se z kolagenu. Celulóza – perspektiva v oblasti krytů ran, jak pro vnější poranění, tak pro ošetření vnitřních ran po chirurgickém zákroku. Chitosan – ve směsi s jinými polymery má velmi dobré antibakteriální vlastnosti, např. nanovlákná z chitosan-polyethyléntereftalátu [39].

3.6.2 Nanovlákná ze syntetických biopolymerů

PLA (kyselina polyléčná) a PGA (kyselina polyglykolová) a jejich kopolymery ve formě vláken vykazují dobré mechanické vlastnosti a zvýšenou odolnost proti vnějšímu prostředí. Nanovláknenné materiály z těchto polymerů jsou vhodné pro nosiče tělních implantátů, jako kryty ran a pro řízené uvolňování léčiv. PCL – polykaprolakton je chemicky i vlastnostmi podobný s PLA a PGA. Nanovláknenné útvary z PCL nacházejí uplatnění v tkáňovém inženýrství jako scaffoldy – lešení pro růst buněk a tkání [39 - 40].

3.6.3 Nanovlákná z anorganických materiálů

Samotná anorganická nanovlákná vznikají až po tepelné kalcinaci, kdy se odstraní pomocný polymer, který je spojen s anorganickou složkou vlákna.

Nanovlákná z TiO_2 nacházejí svoje využití v kosmetice, protože dobře absorbují UV záření. Další využití je ve fotovoltaické technologii – konkrétně u solárních panelů. SiO_2 - skelná vlákna s přídavkem Ag vykazují antibakteriální účinky. Al_2O_3 - nachází uplatnění v tkáňovém inženýrství, ale i v mikroelektronice a optice. ZrO_2 – uplatňuje se např. v kompozitech, kyslíkových senzorech a palivových článcích. $\text{Li}_4\text{Ti}_5\text{O}_{12}$ – prodlužuje životnost baterií, urychluje dobu nabíjení [41 - 43].



3.6.4 Nanovlákná z organických polymerů

Tato nanovlákná nabízí široké spektrum jejich použití: vysoce účinné filtry – PVK, PMMA, PU, PC, PS, PA, separační membrány – CA, výztuhy pro kompozitní materiály – PBI, PA, biologické aplikace – PEVA, Hedvábí/PEO směs, PVF, PVP, PS, tkáňové inženýrství – směs Kolagen-PEO, PLGA [37]. PVA je v současné zkoumáno za účelem použití pro řízené uvolňování léčiv [44]. S nanočásticemi stříbra může tvořit antibakteriální kompozit, který lze použít v textilním průmyslu [45].

3.7 Bakterie pro sterilizační proces

3.7.1 *Escherichia Coli*

Bakterii *E. coli* poprvé izoloval v roce 1885 rakouský lékař a bakteriolog Theodor von Escherich. Nazval ji *Escherichia coli* a byla mnoho dalších let považována za komenzála v tlustém střevě. Avšak v roce 1935 bylo zjištěno, že tato bakterie je příčinou, která může způsobovat průjemová onemocnění [46].

Bakterie *Escherichia coli* je rod gramnegativních, fakultativně anaerobních, bičíkatých bakterií z čeledi Enterobacteriaceae. Běžně vyskytuje ve střevním traktu lidí a teplokrevných živočichů [47].

E. coli je vzhledem k produkci některých vitamínů ve střevě prospěšná, především co se týká produkce vitamínu K a některých vitamínů B [47]. Pro ostatní mikroorganismy působí jako značná bariéra při jejich boji o kyslík a živiny. Při přemnožení je schopná vyvolat onemocnění – průjemy, onemocnění močových cest a nozokominální infekce. Typy kmenů bakterie lze dělit na: enteropatogenní (EPEC), enterotoxigenní (ETEC), enteroinvazivní (EIEC) a enterohemoragické (EHEC). Onemocnění způsobené různými kmeny *E. coli* se šíří většinou kontaminovanými potravinami nebo vodou. Zdrojem nákazy mohou být nemocní lidé nebo i maso z nemocných zvířat, nebo konzumace hotových infikovaných jídel, které se delší dobu nechají stát při pokojové teplotě [46].



E. coli je mikrob ve tvaru tyčinky měřící v průměru 0,4 – 0,7 μm a na délku 1 – 3 μm viz obr. č. 8. Tato bakterie netvoří cysty ani endospory. Pohybují se pomocí bičíků nebo jsou nepohyblivé. Rostou při teplotě 37°C na běžných živných půdách, kmeny izolované z teplokrevných živočichů rostou ještě i při teplotách 45 – 46 °C [46].



Obr. 8 – Bakterie *Escherichia coli* [48]

3.7.2 *Staphylococcus Aureus*

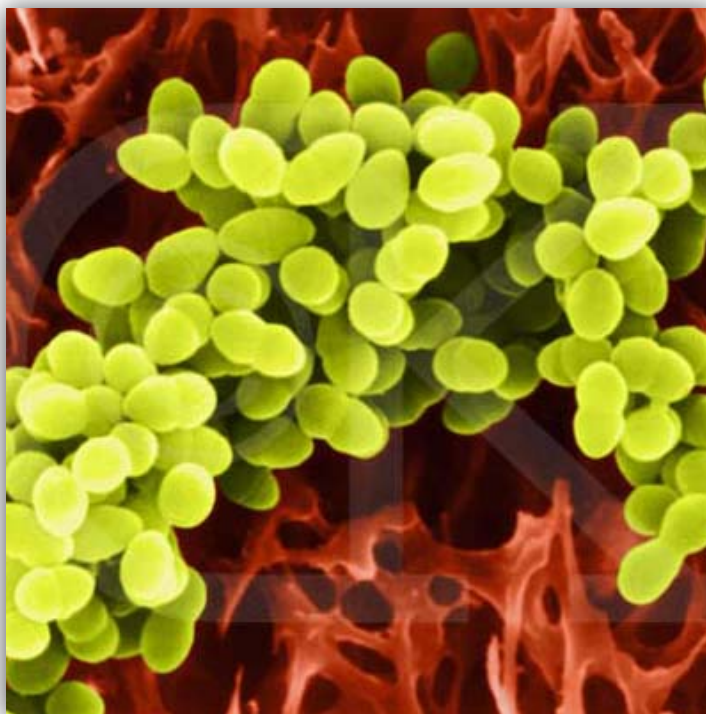
Staphylococcus aureus je grampozitivní bakterie s typickým hroznovitým uspořádáním buněk a zlatavým zbarvením. Z fyziologického hlediska patří tento druh mezi fakultativně anaerobní bakterie. *S. aureus* se od ostatních stafylokoků odlišuje svým typickým zbarvením, schopností fermentovat manitol a pozitivním výsledkem testu na deoxyribonukleázu [49]. Patří mezi běžné mikroorganismy, které se nachází v krku, nose, ve vlasech a na povrchu kůže. Stafylokoky mohou růst a přežít ve vysokých koncentracích solí a cukrů, kde ostatní mikroorganismy nepřežijí [50].

S. aureus je patogenní (choroboplodný) pro člověka i pro ostatní teplokrevné živočichy. Lidský organismus je vůči stafylokokové infekci poměrně značně odolný.



Vypuknutí onemocnění může být způsobeno oslabením organismu nebo infekcí velké dávky virulentního kmene – např. při chirurgickém zákroku, úrazu, umělé náhrady, zavedení katétru atd. Nejčastěji infikovanou potravinou je maso [50].

Stafylokoky tvoří kolonie na médiu, které je bohaté na živiny. Jsou však nepohyblivé a nevytváří spory [49]. Mají tvar neopouzdrěného sférického koku (viz obr. č. 9) s průměrem okolo 1 μm , pouzdro tvoří jen některé kmeny. *Staphylococcus aureus* může růst při teplotách od 6,5°C – 48°C i při koncentracích NaCl vyšších než 15%. Mohou se vyskytovat jednotlivě nebo ve dvojicích a v nepravidelných shlucích hroznového tvaru [50].



Obr. 9 – Bakterie *Staphylococcus aureus* [51]



4 Experimentální část

Cílem diplomové práce je získat experimentální zkušenosti s použitím plazmových výbojů v biologii a lékařství. Je všeobecně známo, že plazmový výboj dokáže kromě povrchové funkcionalizace materiálu také povrchy sterilizovat. Hlavním účelem bylo vytvoření funkčního komplexu pro další navázání protilátek s využitím plazmové funkcionalizace povrchů nanovláknenných materiálů. Vzhledem k tomu, že se předpokládá využití takto upravených nanovláken v lékařských aplikacích, součástí diplomové práce je i sterilizace nanovláken s využitím plazmatu. To by umožňovalo zpracování nanovláken provádět v rámci jednoho procesu.

Jako testovaný materiál byla použita biokompatibilní a biodegradabilní nanovláknina (PVA a PCL), která nachází v současné době rozvoj a využití právě v lékařství. Pro porovnání výsledků byla použita také anorganická nanovláknina (SiO_2).

V první části experimentu se zaměříme na oblast účinků plazmatu u funkcionalizace povrchu – navazování funkčních skupin na povrch nanovláken za účelem dalšího navázání léčiv a peptidů pro jejich řízené uvolňování.

V druhé části experimentu se zaměříme na sterilizaci nanovláken od bakterií *E. Coli* a *S. Aureus*. Bakterie na nanovláknina byly očkovány na Katedře chemie FP TUL ve spolupráci s Mgr. Irenou Šlamborovou, Ph.D. Využití aparatury pro plazmové modifikace s MW zdrojem nám bylo umožněno ve firmě SurfaceTreat a.s. v Turnově.

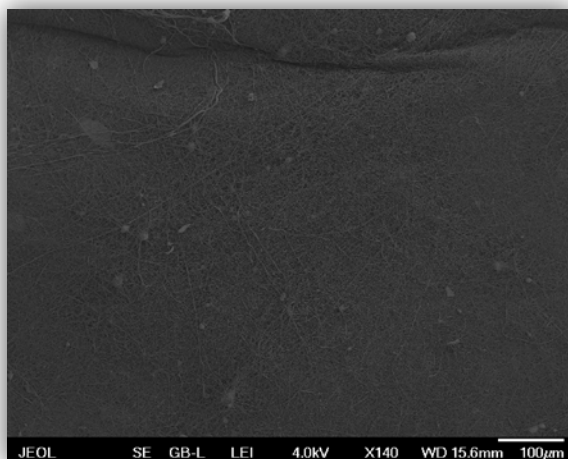
4.1 Výběr nanovláknenných materiálů

Na základě rešerše odborné literatury a dostupných znalostí byly vybrány typy nanovláknenných materiálů, vhodné chemikálie a princip plazmového zpracování.

PVA – *polyvinylalkohol* (viz obr. č. 10a, 10b) jsou biodegradabilní nanovláknina na bázi organického syntetického polymeru PVA, která jsou rozpustná ve vodě.

PCL – *poly(ϵ -kaprolakton)* (viz obr. č. 11a, 11b) je syntetický alifatický polyester. Nemodifikovaný má silně hydrofobní charakter.

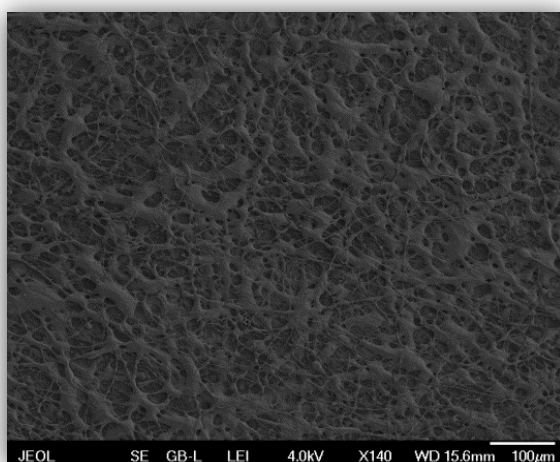
SiO_2 – *oxid křemičitý* (viz obr. č. 12a, 12b) neboli skelná nanovláknina. Jedná se o anorganická nanovláknina.



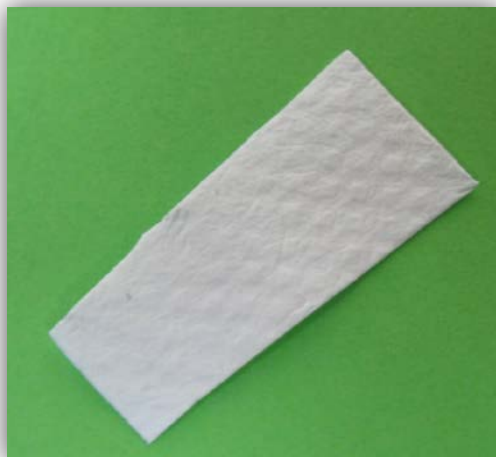
Obr. 10a – Nanovláknna PVA na snímku ze SEM



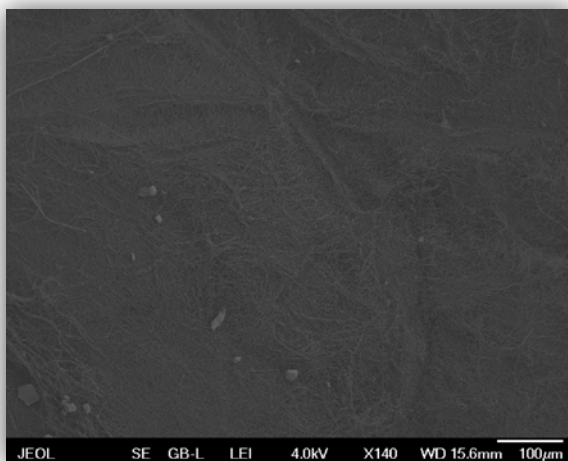
Obr. 10b – Nanovláknna PVA



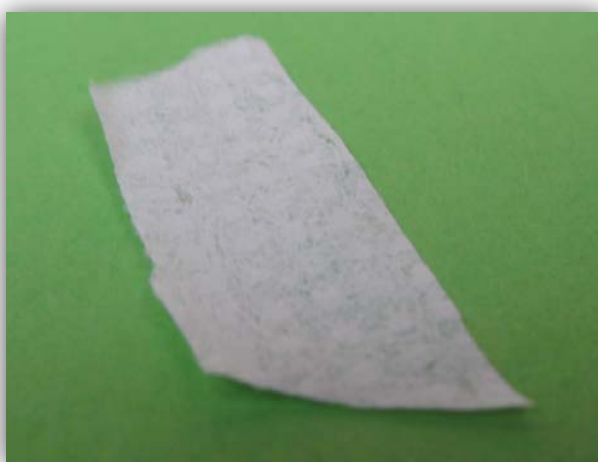
Obr. 11a – Nanovláknna PCL na snímku ze SEM



Obr. 11b – Nanovlákná PCL



Obr. 12a – Nanovlákná SiO₂ na snímku ze SEM



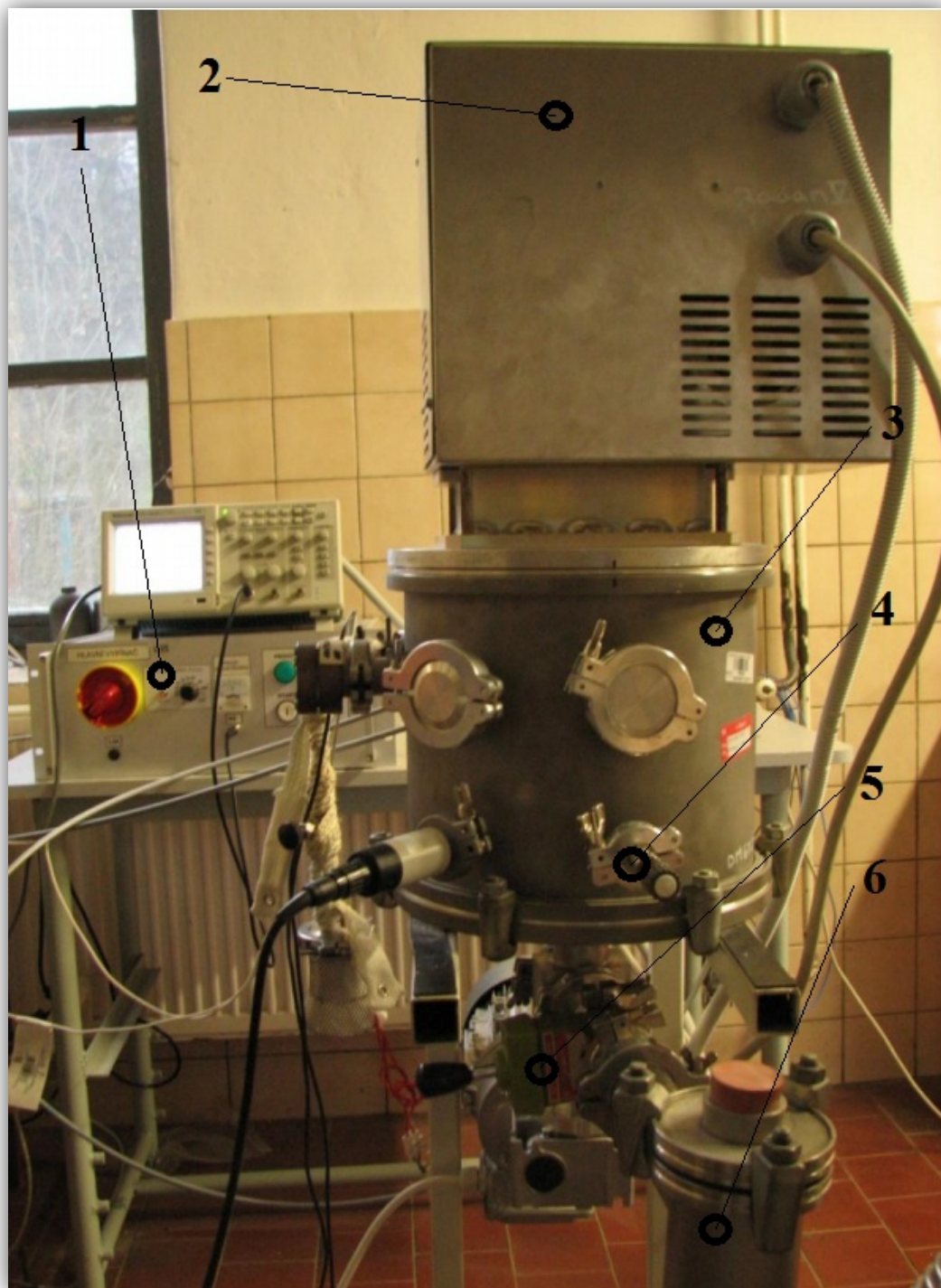
Obr. 12b – Nanovlákná SiO₂



4.2 MW plazmový vakuový systém

Pro modifikace byla použita aparatura firmy SurfaceTreat a.s. v pobočce Turnov. Podstatou experimentu je vytvoření nízkotlakého plazmatu, kde testovaný vzorek není uložen přímo v plazmovém výboji, ale účinky plazmatu na něj působí díky proudění použitých procesních plynů a vzniklých volných radikálů (tzv. downstream systém). Tento systém konfigurace umožňuje zpracování i citlivých materiálů (např. termolabilní materiály jako polymery atd.).

Aparatura (viz obr. č. 13) je složena z MW zdroje firmy Radan s.r.o. a zdrojové hlavy pro buzení plazmatu, komory z nerezové oceli ve tvaru válce (recipientu) a vakuových vývěv – rotační a rootsovy vývěvy. Mezi recipientem a vlnovcem je deskový ventil, kterým se reguluje tlak uvnitř recipientu. Recipient, do kterého přivádíme pracovní plyny, obsahuje příruby, do kterých lze podle potřeby připojit další zařízení – např. optický spektrometr nebo měřič tlaku. Dávkování pracovních plynů nám zajišťuje hmotnostní průtokoměr od firmy MKS. Je složen ze samostatného automatického ventilu a řídicí jednotky, která plyny dávkuje v rozmezí 0 až 200 sccm. Další chemické látky, používané pro funkcionalizaci nanovláken, byly do komory vakuového zařízení přiváděny ve formě par pomocí výparníku, připojeného do systému jehlovým ventilem, kterým bylo také regulováno jejich dávkování. Na dně komory je výškově nastavitelný rotační stolek, na který jsou ukládány zpracovávané materiály.



Obr. 13 – Aparatura pro plazmové výboje s MW zdrojem –

1 – mikrovlnný zdroj Radan, 2 – zdrojová hlava pro buzení plazmatu, 3 – komora plazmového výboje, 4 – ventil pro vyrovnání tlaku po modifikaci, 5 – redukční (uzavírací) ventil od vývěv, 6 – potrubí mezi komorou a vývěvami



4.3 Funkcionalizace nanovláknenných materiálů

4.3.1 Optimalizace procesních parametrů

Na základě odborné rešerše byly vybrány chemické funkční skupiny, kterými bude funkcionizován povrch nanovláknenných materiálů PVA, PCL a SiO₂ s ohledem na získání funkčního komplexu pro navázání léčiv. Pro tento účel se jeví nejvýhodněji skupiny hydroxylové (-OH), karboxylové (-COOH) a aminové (-NH₂). Vzhledem k tomu, že firma SurfaceTreat a.s. má bohaté zkušenosti s hydrofilizací povrchu polymerních materiálů prostřednictvím povrchové funkcionizace -OH skupinami, pro prvotní optimalizační testy byl zvolen právě tento proces.

Funkcionizaci povrchu vytvořením -OH skupin lze nejjednodušeji docílit prostřednictvím plazmové modifikace s použitím O₂ nebo vzduchu jako pracovního plynu. Tato metodika je zároveň nejrychlejší, nejlevnější a z hlediska technologického postupu nejjednodušší. Pro prvotní testy byly nastaveny parametry uvedené v následující tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Procesní parametry modifikace

Nanovláknna	Průtok použitého pracovního plynu (sccm)			
	Vzduch	O ₂	Tlak (Pa)	Doba modifikace (s)
PVA	100	100	100	60
PCL	100	100	100	60

Po provedení prvotních testů se ukázalo, že modifikované vzorky obou nanovláknenných materiálů degradují při použití O₂ jako procesního plynu (viz obr. č. 14a a 14b). Degradace nanovláknenných materiálů se projevila i při použití vzduchu jako procesního plynu viz obr č. 15a a 15b.



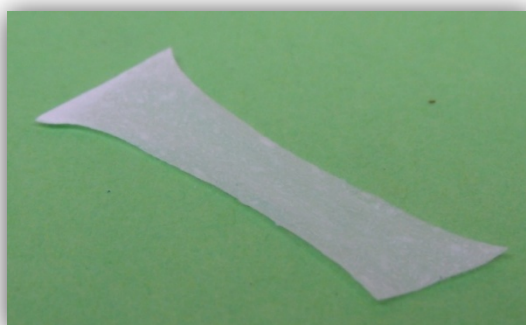
Obr. 14a – Degradovaná nanovláknna PVA po ošetření v O_2



Obr. 14b – Degradovaná nanovláknna PCL po ošetření v O_2



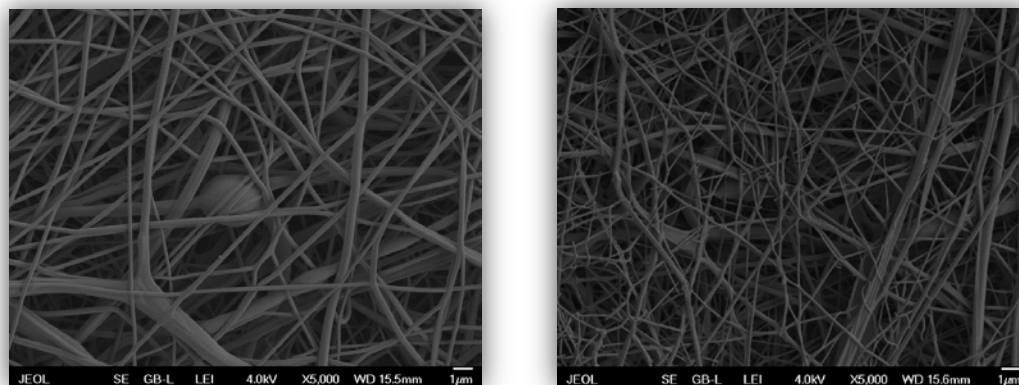
Obr. 15a – Degradovaná nanovláknna PVA po ošetření vzduchem



Obr. 15b – Degradovaná nanovláknna PCL po ošetření vzduchem

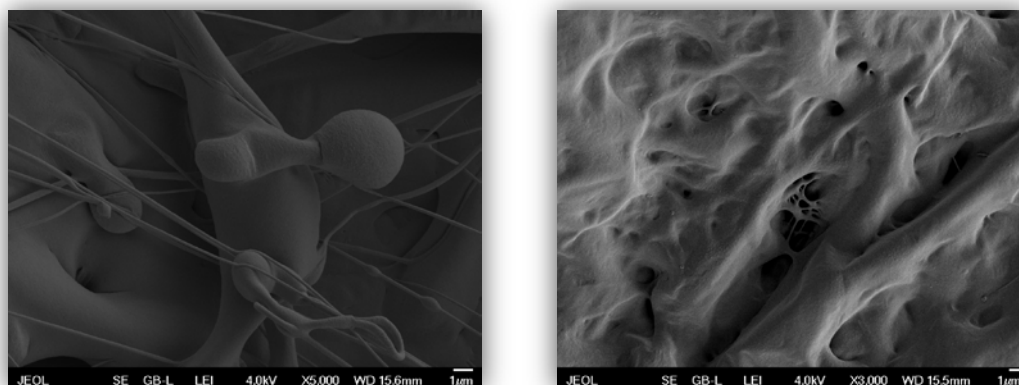


Pro podrobnější zkoumání byla na vzorcích PVA i PCL provedena analýza skenovací elektronovou mikroskopií (SEM). Srovnání SEM snímků nemodifikovaných vzorků a vzorků po modifikaci je uvedeno na obr. č. 16a, 16b a obr. č. 17a, 17b.



Obr. 16 a – Nemodifikovaná nanovlákná PVA, snímek ze SEM

b – Nanovlákná PVA po modifikaci v O₂, snímek ze SEM



Obr. 17 a – Nemodifikovaná nanovlákná PCL, snímek ze SEM

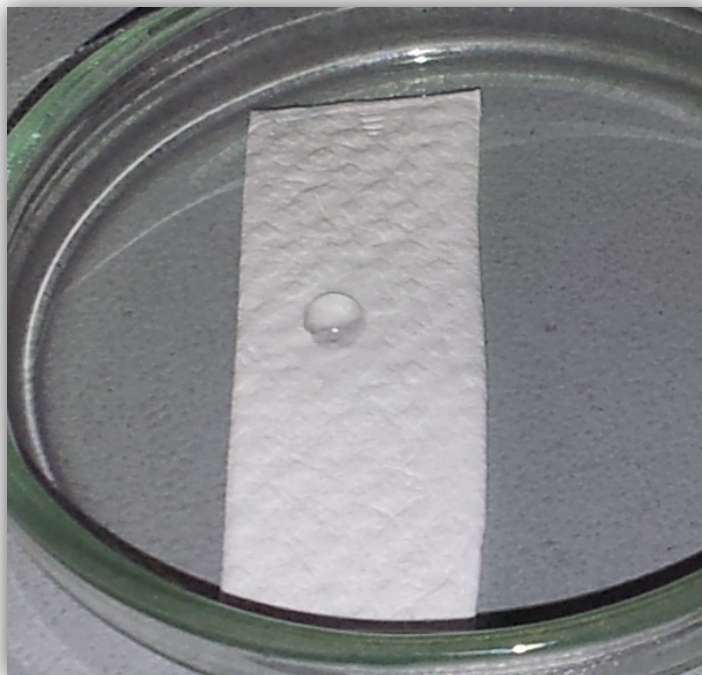
b – Nanovlákná PCL po modifikaci v O₂, snímek ze SEM

V další fázi experimentu byly z důvodu zamezení degradace nanovláken provedeny variace vstupních procesních parametrů modifikačního procesu funkcionalizace a realizována řada experimentů. Hlavními proměnnými parametry byla doba modifikace a výkon MW zdroje, sloužícího ke generování plazmového výboje. Doba modifikace byla testována v rozmezí od 15 do 60 sekund (doba modifikace byla navyšována po 5 sekundách) a zároveň byl snižován výkon MW zdroje v rozmezí od



100 % do 40 % (výkon byl snižován postupně po 10 %). Průtok pracovního plynu byl konstantní 100 sccm a tlak 100 Pa.

Vzhledem k tomu, že prozatím není k dispozici metodika, která by umožňovala přesné měření účinnosti funkcionalizace nanovláken bezprostředně po zpracování v plazmovém výboji, byla pro orientační zhodnocení provedena zkouška měření smáčivosti kapkou. Na obr. č. 18 je zobrazen snímek znázorňující použití kapkové metody pro orientační zhodnocení účinnosti funkcionalizace na materiálu PCL. Vzhledem k tomu, že nemodifikovaný PCL má hydrofóbní charakter, poté co je kapka na materiál nanesena, zůstává na povrchu a nevsakuje se dovnitř ani po 5 minutách od nanesení. Pro orientační hodnocení smáčivosti, pokud se kapka nevsákla do materiálu dříve, byl zvolen limit 30 sekund a poté byl pořízen fotografický snímek kapky.



Obr. 18 – Použití kapkové metody pro orientační zhodnocení účinnosti funkcionalizace na materiálu PCL



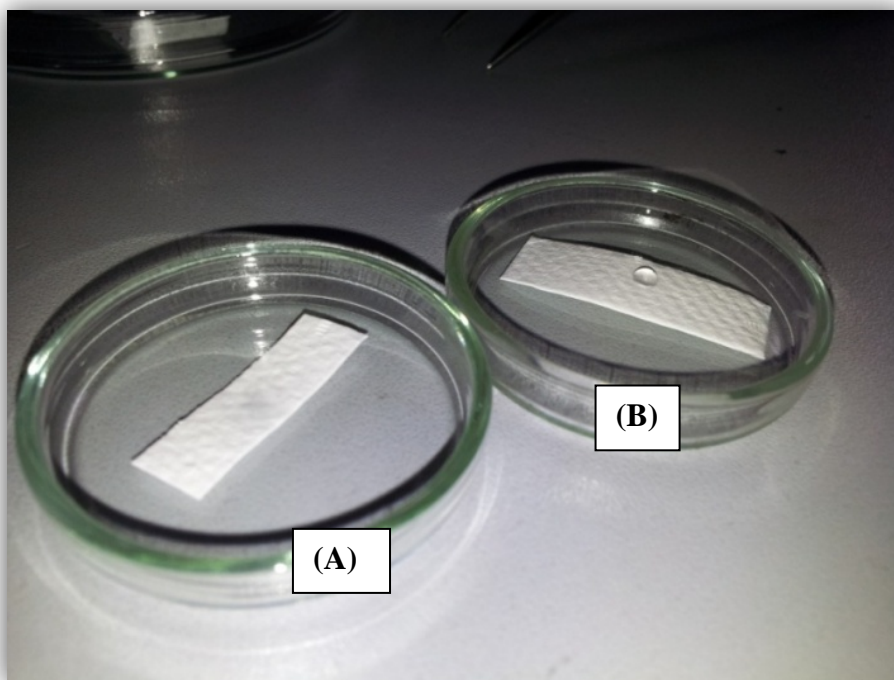
4.3.2 Funkcionalizace nanovláknenných materiálů PVA , PCL a SiO₂

Na základě výsledků experimentů provedených v rámci optimalizace parametrů funkcionizace nanovláken a rešerše odborné literatury byly zvoleny procesní parametry s cílem získat funkční povrch nanovláknenných materiálů pro požadované aplikace. Procesní parametry byly voleny s ohledem na zamezení degradace nanovláken během plazmového zpracování.

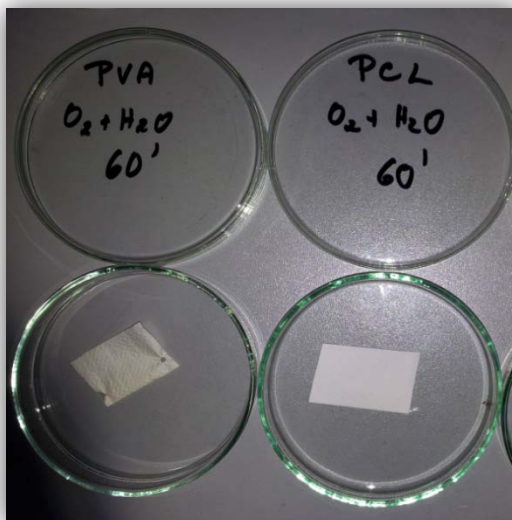
Pro rychlé orientační zhodnocení účinnosti funkcionizace byla provedena zkouška smáčivosti kapkou.

Funkční skupiny (-OH)

Na základě experimentálních zkušeností firmy SurfaceTreat a.s. v oblasti funkcionizace polymerních materiálů a rešerše odborné literatury byla pro navázání funkčních (-OH) skupin vybrána kombinace pracovní směsi O₂ s parami H₂O. Doba funkcionizace trvala 60 s při 100 % výkonu MW zdroje. Průtok pracovního plynu činil 100 sccm a tlak ve vakuovém systému byl udržován na konstantní hodnotě 100 Pa.



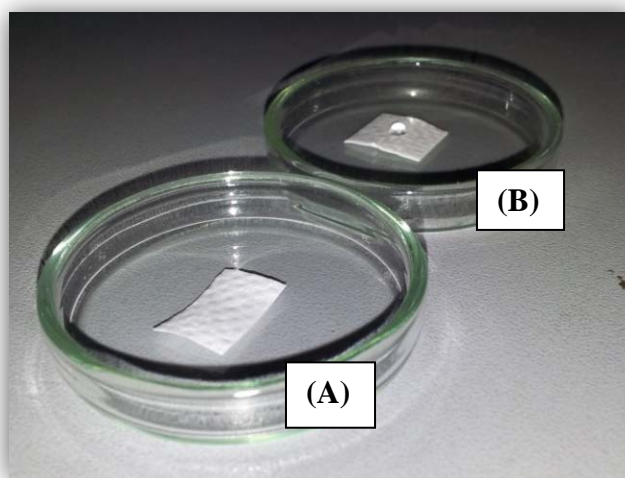
Obr. 19 - Nanovláknna PCL, kapková metoda – (A) po funkcionizaci (v O₂ a H₂O, 60s), (B) nemodifikováno



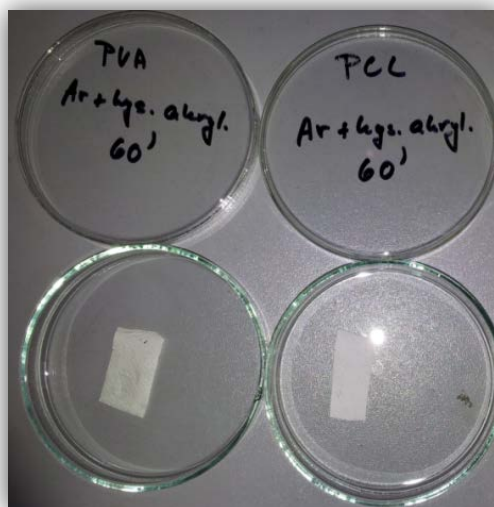
Obr. 20 – Nanovláknenné materiály PVA a PCL po funkcionalizaci (v O_2 a H_2O , 60s)

Funkční skupiny (-COOH)

Pro funkcionalizaci nanovláknenných materiálů PVA a PCL byla na základě rešerše odborné literatury vybrána kombinace pracovní směsi argonu (Ar) a kyseliny akrylové (C_2H_3COOH). Doba funkcionalizace trvala 60 sekund při 100 % výkonu MW zdroje. Průtok pracovního plynu činil 100 sccm a tlak ve vakuovém systému byl udržován na konstantní hodnotě 100 Pa.



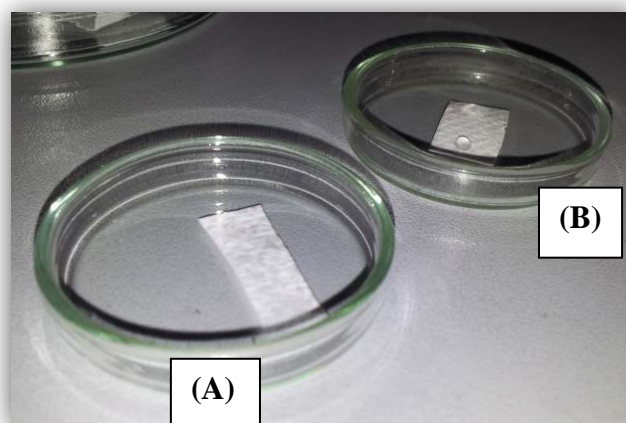
Obr. 21 – Nanovláknna PCL, kapková metoda – (A) po funkcionalizaci (v Ar a C_2H_3COOH , 60s), (B) nemodifikováno



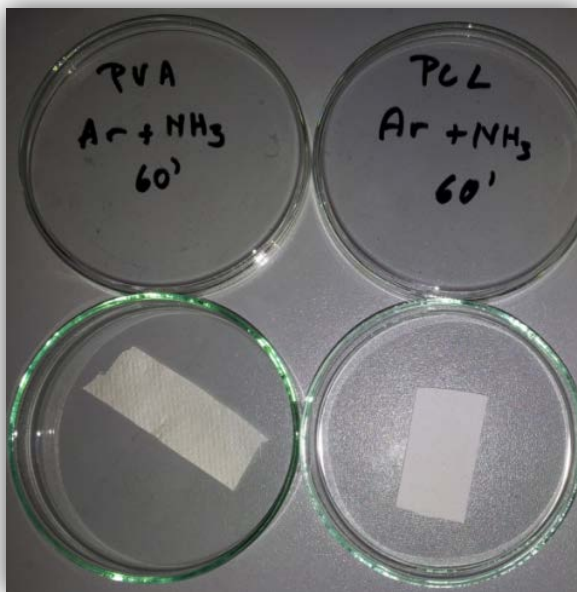
Obr. 22 – Nanovláknenné materiály PVA a PCL po funkcionalizaci (v Ar a C_2H_3COOH , 60s)

Funkční skupiny ($-NH_2$)

Pro vytvoření aminových skupin na povrchu nanovláknenných materiálů PVA a PCL byla provedena funkcionalizace s použitím pracovní směsi Ar a 25 % vodného roztoku amoniaku. Průtok pracovního plynu činil 100 sccm a tlak ve vakuovém systému byl udržován na konstantní hodnotě 100 Pa. Doba funkcionalizace trvala 60 sekund při 100 % výkonu MW zdroje.



Obr. 23 – Nanovláknna PCL, kapková metoda – (A) po funkcionalizaci (v Ar a NH_3 , 60s), (B) nemodifikováno

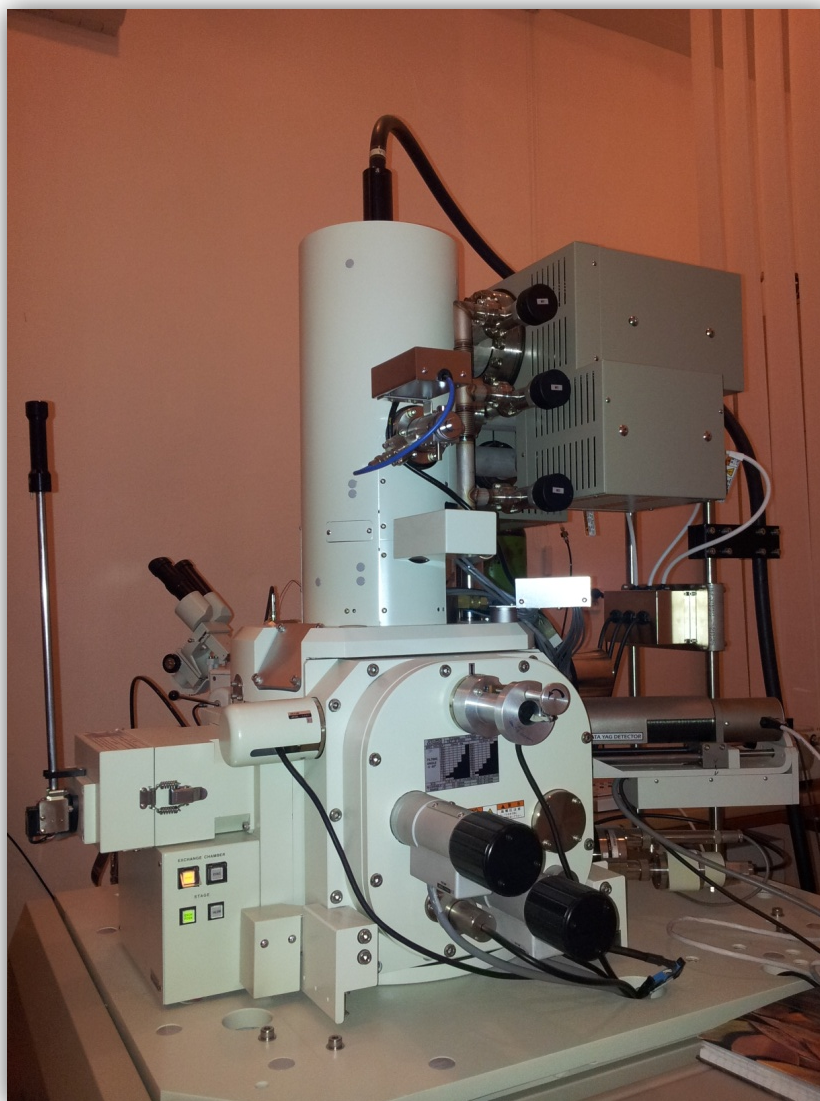


Obr. 24 – Nanovláknenné materiály PVA a PCL po funkcionalizaci (v Ar a NH₃, 60s)

4.3.3 Analýza SEM

Povrch nanovláken byl podroben analýze pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) viz obr. č. 26 - 32. Pozorování bylo umožněno na Parazitologickém ústavu v Českých Budějovicích na přístroji JEOL 7401F (viz obr. č. 25) a v akciové společnosti Škoda Auto v Mladé Boleslavi na přístroji VEGA TESCANA.

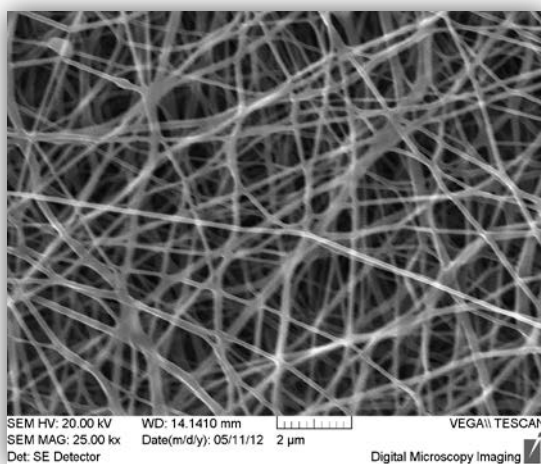
Aby bylo možné vzorky zkoumat, musely být pokoveny nanovrstvou zlata (o tloušťce asi 10 – 20 nm), nosným plynem byl Ar. To bylo provedeno na přístroji BAL-TEC SCD 050 - díky principu iontového naprašování. Samotný proces pokovení trval 4 minuty.



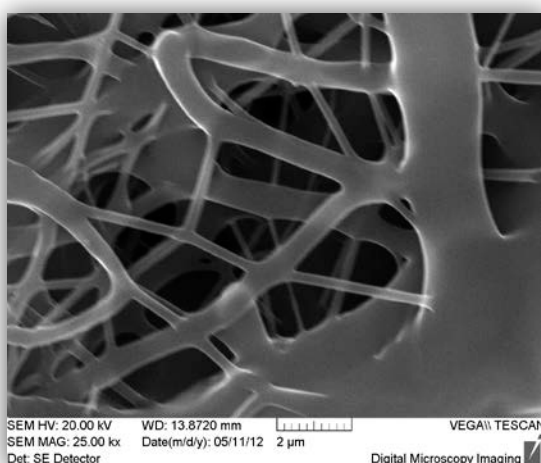
Obr. 25 – JEOL 7401F – skenovací elektronový mikroskop (České Budějovice)



Nanovláknna po funkcionalizaci v $O_2 + H_2O$



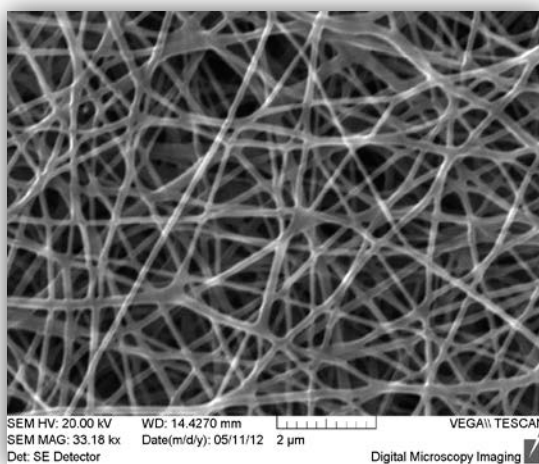
Obr. 26 – Nanovláknna z PVA po funkcionalizaci v $O_2 + H_2O$



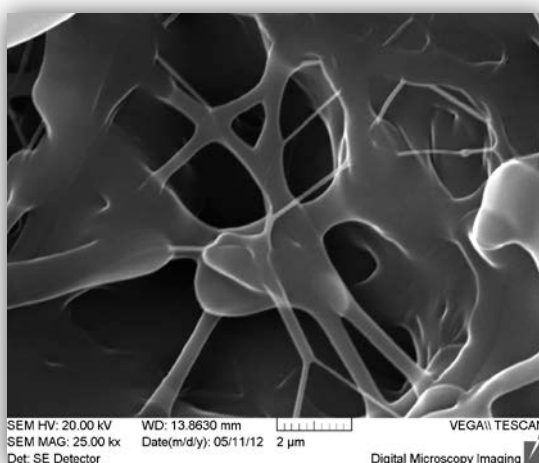
Obr. 27 – Nanovláknna z PCL po funkcionalizaci v $O_2 + H_2O$



Nanovláknna po funkcionalizaci v Ar + NH₃



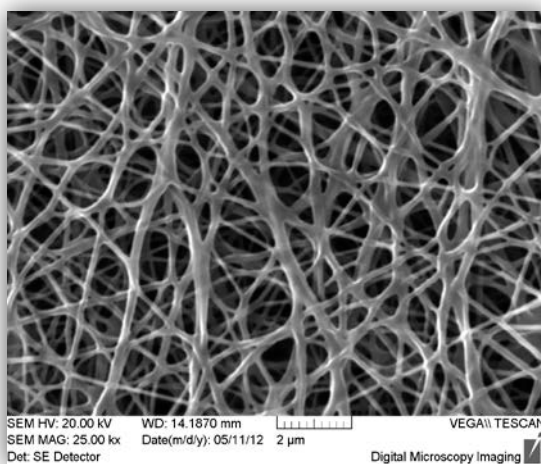
Obr. 28 – Nanovláknna z PVA po funkcionalizaci v Ar + NH₃



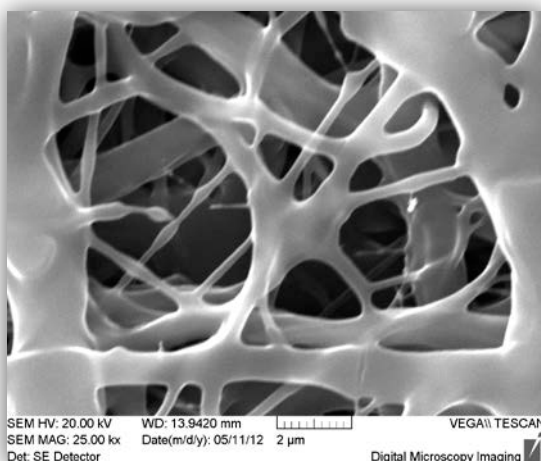
Obr. 29 – Nanovláknna z PCL po funkcionalizaci v Ar + NH₃



Nanovláknna po funkcionalizaci v Ar + C₂H₃COOH



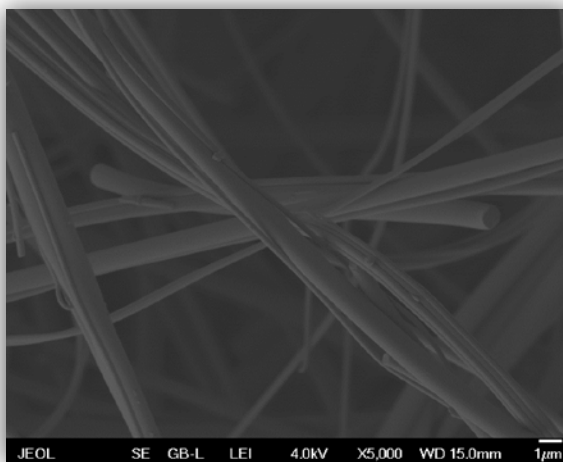
Obr. 30 – Nanovláknna z PVA po funkcionalizaci v Ar + C₂H₃COOH



Obr. 31 – Nanovláknna z PCL po funkcionalizaci v Ar + C₂H₃COOH



Nanovláknna po funkcionalizaci v O₂



Obr. 32 – Nanovláknna z SiO₂ po funkcionalizaci v O₂ po 60 s

4.3.4 Analýza ESCA (XPS)

Analýza ESCA byla provedena RNDr. Zdeňkem Bastlem, CSc. na ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR v Praze. Kromě vzorků výchozího materiálu (zero sample) byly zkoumány vzorky z PVA a PCL po funkcionalizaci, zpracované ve směsích Ar + NH₃, O₂ + H₂O a Ar + C₂H₃COOH.

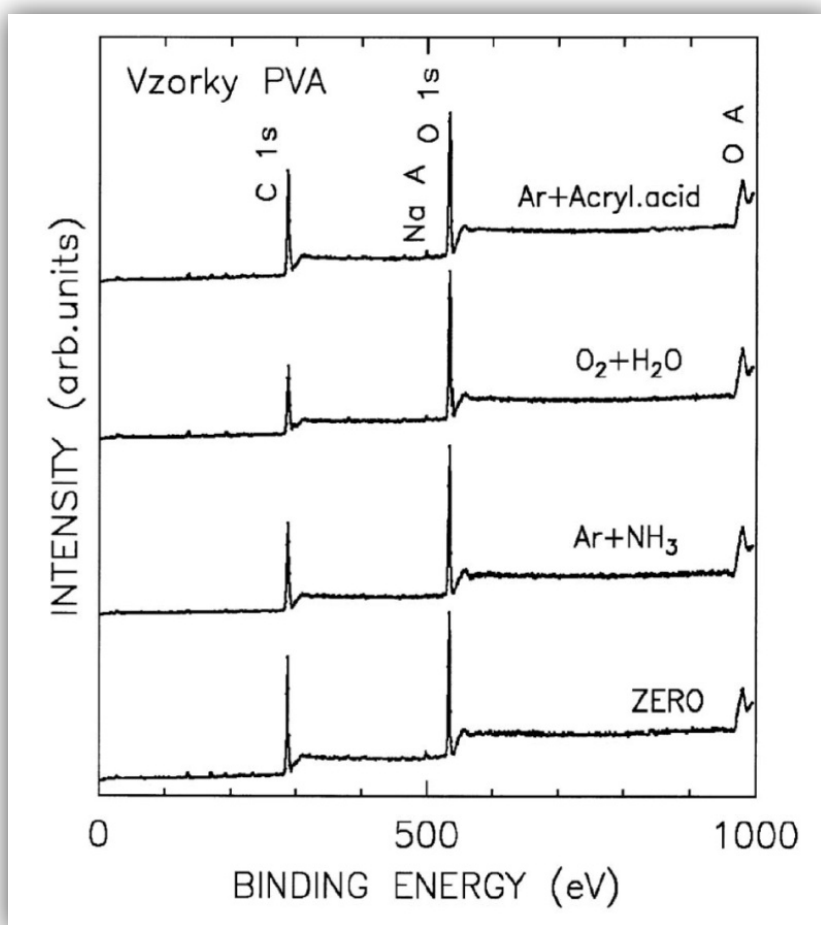
Ke studiu vzorků byla použita metoda rentgenoelektronové spektroskopie, známá pod zkratkou XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy) viz obr. č. 33. Měření bylo prováděno za tlaku zbytkových plynů 10⁻⁹ mbar. K excitaci fotoelektronů bylo použito záření Al K α . Byla změřena spektra v oboru vazebných energií 0 – 1000 eV a v režimu vysokého rozlišení byly změřeny linie C 1s, O 1s, P 2p, N 1s příp. též S 2p, K 2s a Na 1s fotoelektronů. Chyba v hodnotách změřených vazebných energií činí ± 0.2 eV. Povrchová stechiometrie byla vypočtena z integrálních intenzit fotoemisních linií po odečtu nelineárního (Shirleyho) pozadí, korekci na transmisní funkci použitého hemisférického analyzátoru elektronů a na teoretické (Scofieldovy) hodnoty parciálních fotoionizačních průřezů. Obvyklá chyba takto získaných hodnot koncentrací činí $\pm 10\%$. Překrývající se linie, odpovídající neekvivalentním chemickým stavům prvků byly fitovány Gauss - Lorentzovými funkcemi (k fitování byl použit software XPSPEAK 4.1.).



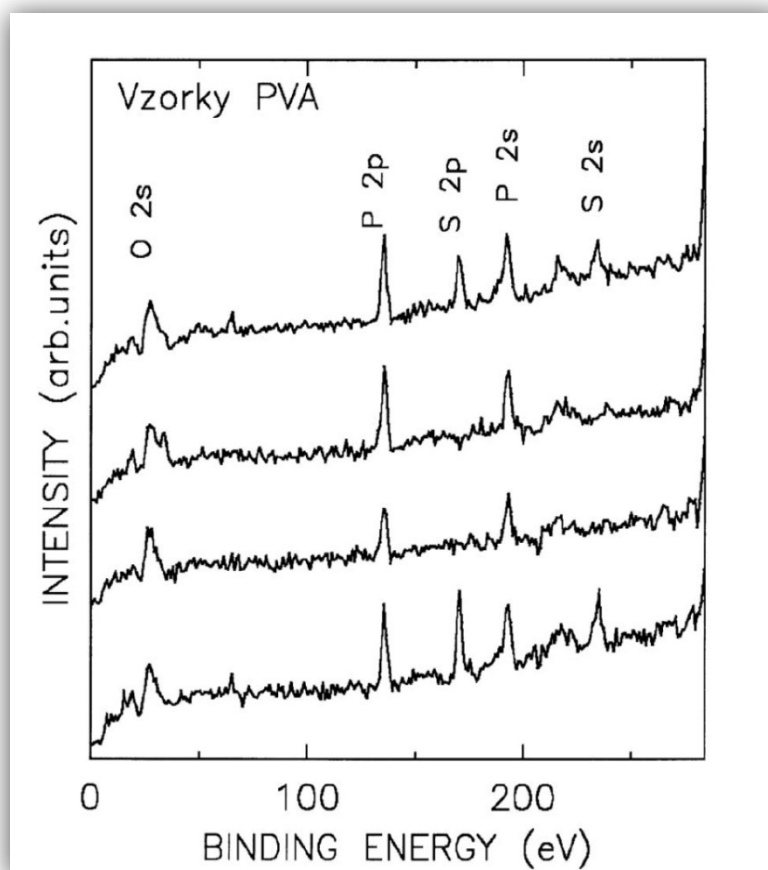
Obr. 33 – Přístroj pro XPS analýzu

Nanovlákná z PVA - výsledky:

Na obr. č. 34. jsou fotoelektronová spektra vzorků měřená v oboru vazebných energií 0 - 1000 eV, na obr. č. 35. je detail těchto spekter v oboru vazebných energií 0 - 280 eV. Tato spektra poskytují informaci o prvcích přítomných v povrchové vrstvě studovaných materiálů. Tloušťka této vrstvy je determinována neelastickou střední volnou drahou elektronů λ ve studovaném materiálu. Pro kolmou fotoemisi činí informační hloubka metody XPS $\sim 3\lambda$, pro elektrony emitované pod úhlem θ od roviny povrchu vzorku $\sim 3\lambda \sin \theta$. Pro vzorky měřených polymerů a oblast kinetických energií, ve kterých se nacházejí měřená spektra C 1s, N 1s, P 2p, S 2p a O 1s činí hodnota λ vypočtená z rovnice [52] TPP-2M ~ 3.6 nm. Odtud vyplývá, že informace uvedené v tomto sdělení (byla měřena spektra fotoelektronů emitovaných 45° od geometrického povrchu vzorku) se týkají povrchové vrstvy vzorku o tloušťce rovné přibližně 7-8 nm.



Obr. 34 – Spektra vzorků PVA změřená v oboru vazebních energií 0 – 1000 eV

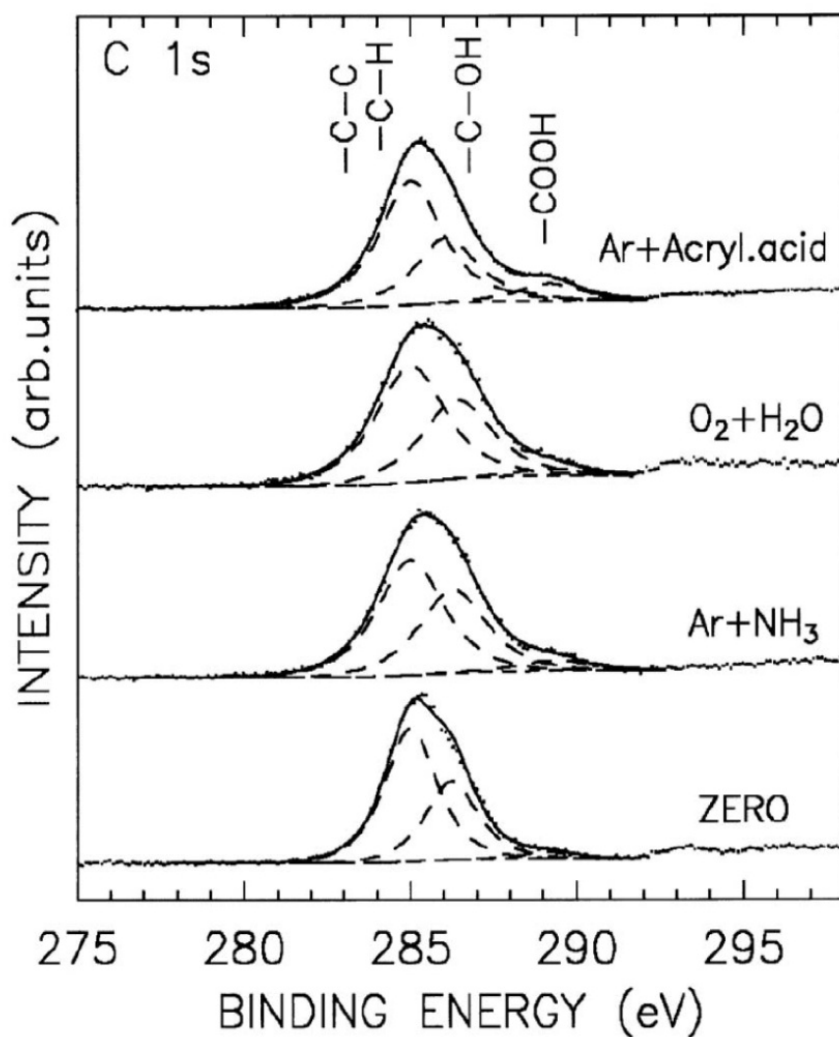


Obr. 35 - Spektra vzorků PVA změřená v oboru vazebních energií 0 – 280 eV (vyexpandovaná část spekter z obr. č. 34, ve stejném pořadí jako na obr. č. 34)

Z integrálních intenzit jednotlivých fotoemisních linií, změřených při vysokém rozlišení, byly vypočteny za předpokladu homogenního vzorku hodnoty atomárních koncentrací identifikovaných prvků, které jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Povrchové atomární koncentrace prvků, vzorky PVA (at. %)

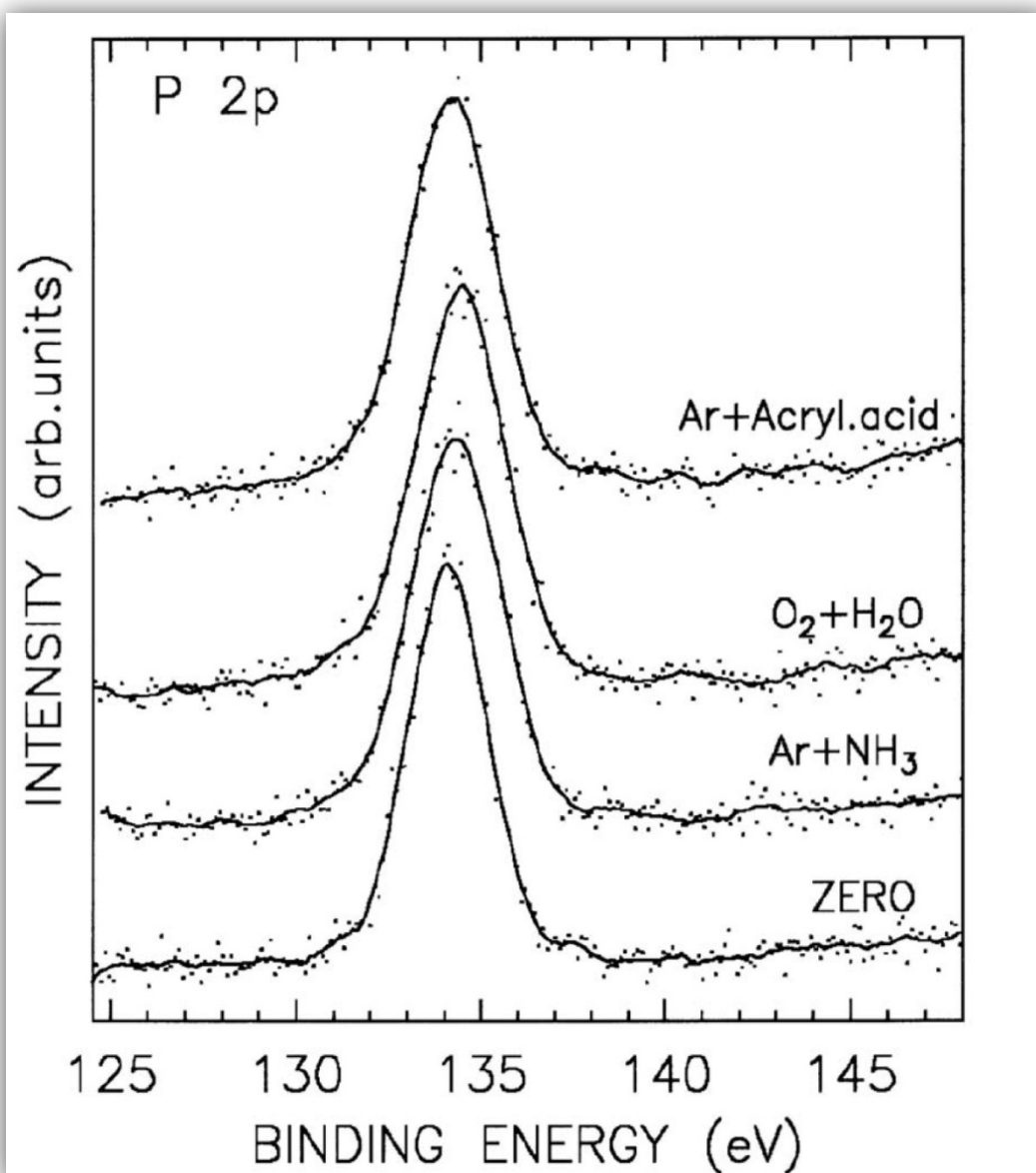
Prvek Vzorek	C	O	P	N	S	Na	K
PVA (zero sample)	67.04	28.51	1.85	0.68	1.48	-	0.44
PVA (Ar + NH ₃)	65.60	32.14	1.64	0.62	~0	-	-
PVA (O ₂ + H ₂ O)	58.30	37.19	2.93	~0	~0	0.93	0.65
PVA (Ar + C ₂ H ₃ COOH)	64.77	29.85	1.89	1.00	0.84	1.00	0.65



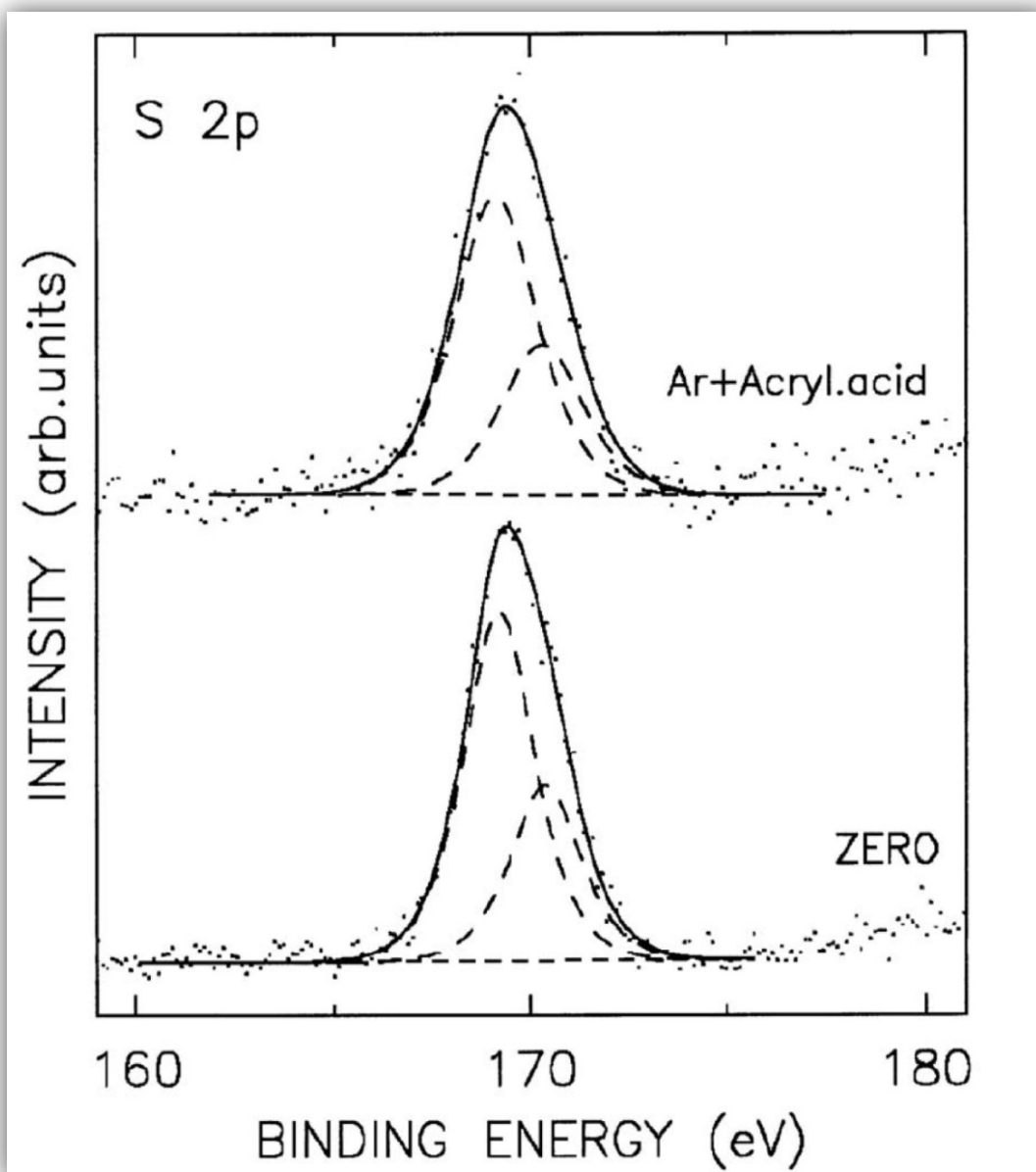
Obr. 36 – Spektra C 1s fotoelektronů vzorků PVA (spektra jsou normovaná na stejnou výšku)

Tabulka č. 3: Zastoupení chemických stavů C ve vzorcích PVA (v %)

Funkční skupina	C-C-CH	C-O-	C-OO-
Vzorek			
PVA (zero sample)	67.0	32.0	0
PVA (Ar + NH ₃)	55.1	40.0	4.9
PVA (O ₂ + H ₂ O)	57.8	39.2	3.0
PVA (Ar + C ₂ H ₃ COOH)	60.3	31.3	8.4



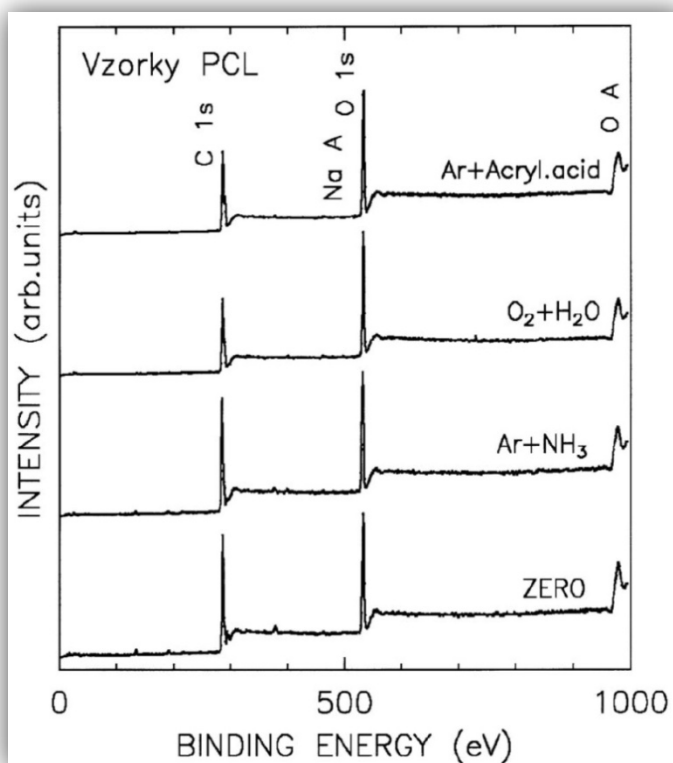
Obr. 37 – Spektra P 2p fotoelektronů vzorků PVA (spektra jsou normována na stejnou výšku)



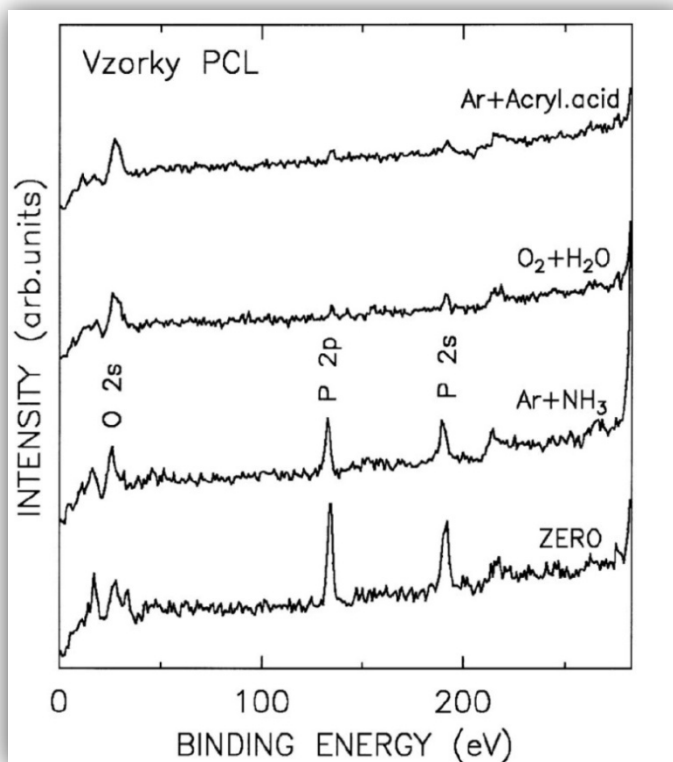
Obr. 38 – Spektra S 2p fotoelektronů vzorků PVA (spektra jsou normována na stejnou výšku)

Nanovlákná z PCL - výsledky:

Na obr. č. 39 jsou fotoelektronová spektra vzorků PCL změřená v oboru vazebných energií 0 - 1000 eV, na obr. č. 40 je detail těchto spekter v oboru vazebných energií 0 - 280 eV.



Obr. 39 - Spektra vzorků PCL změřená v oboru vazebných energií 0 – 1000 eV



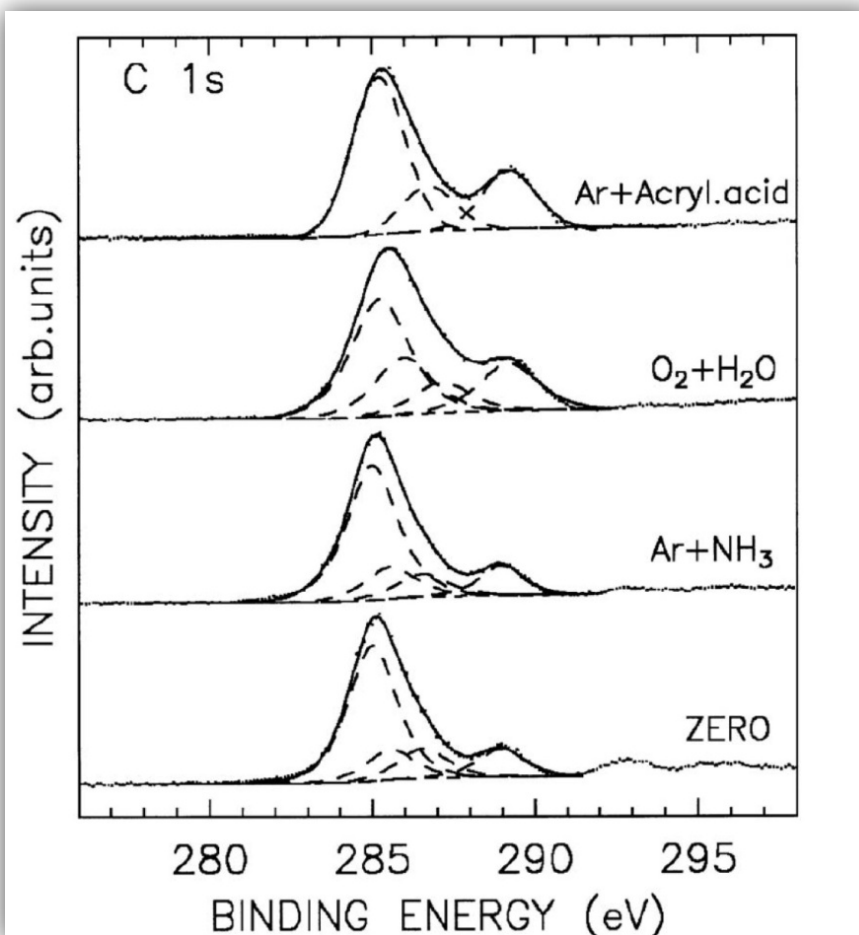
Obr. 40 - Spektra vzorků PCL změřená v oboru vazebných energií 0 – 280 eV
(vyexpandovaná část spekter z obr. č. 39, ve stejném pořadí jako na obr. č. 39)



Z integrálních intenzit fotoemisních linií, změřených při vysokém rozlišení, byly vypočteny hodnoty atomárních koncentrací identifikovaných prvků, které jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: Povrchové atomární koncentrace prvků, vzorky PCL (at. %)

Prvek Vzorek	C	O	P	N	Na	K
PCL (zero sample)	72.6	25.5	1.45	0.15	-	0.3
PCL (Ar + NH ₃)	74.6	23.6	0.87	0.53	-	0.4
PCL (O ₂ + H ₂ O)	72.7	26.9	0.26	0.12	-	-
PCL (Ar + C ₂ H ₃ COOH)	67.2	32.8	0	0	0	0



Obr. 41 – Spektra C 1s fotoelektronů vzorků PCL (spektra jsou normovaná na stejnou výškou)

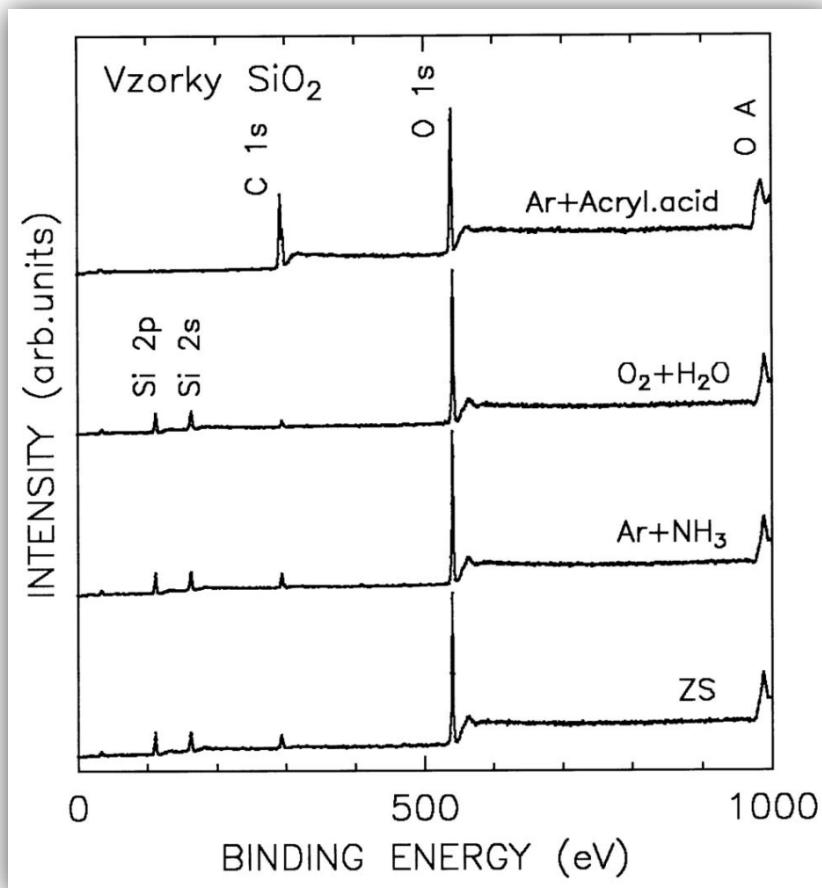


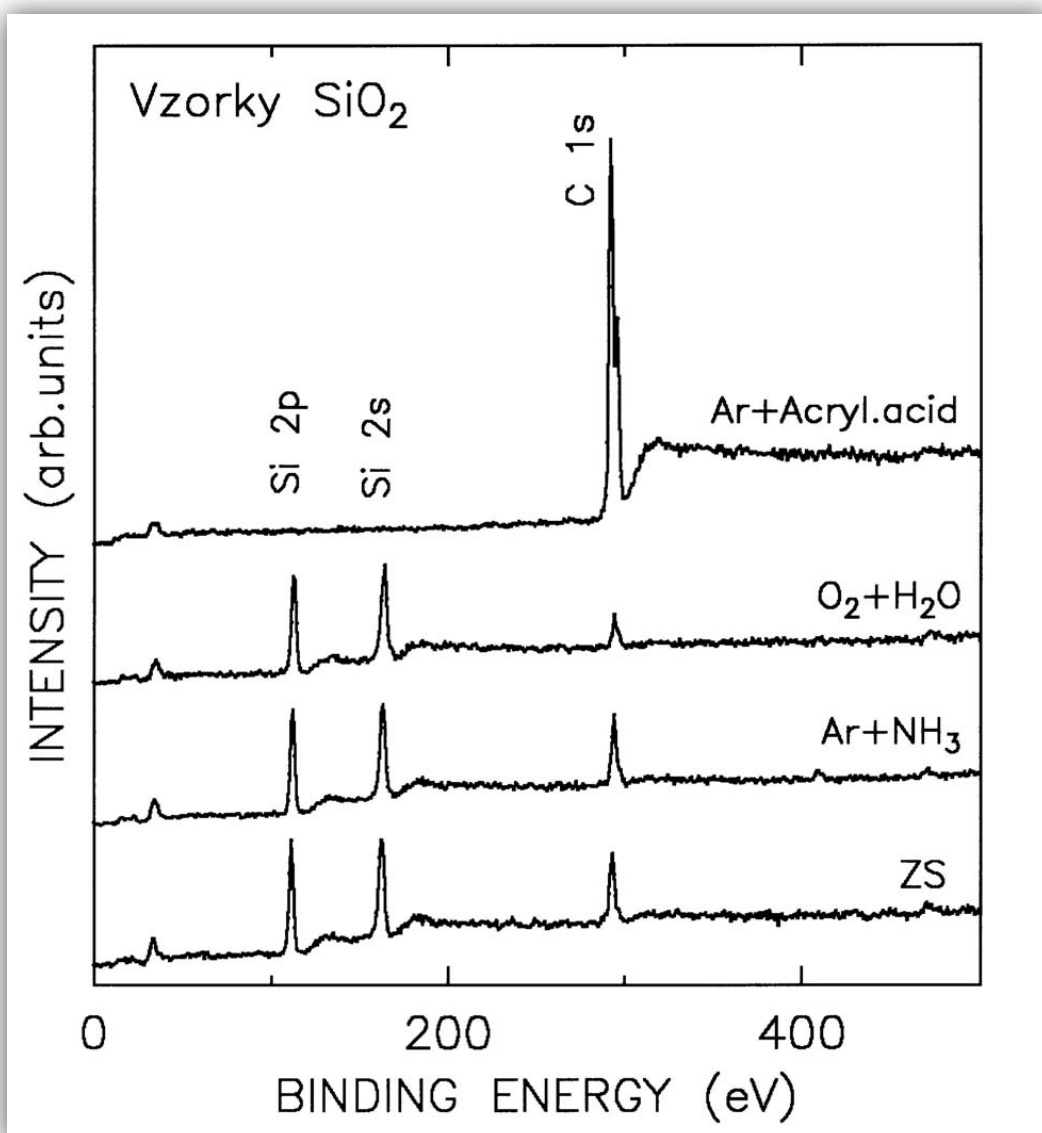
Tabulka č. 5: Zastoupení chemických stavů C ve vzorcích PCL (v %)

Funkční skupina Vzorek	C-C, -CH	C [*] H ₂ -COO-	CH ₂ -O-	COO-
PCL (zero sample)	61.3	13.4	12.4	11.9
PCL (Ar + NH ₃)	62.8	14.9	10.7	11.6
PCL (O ₂ + H ₂ O)	47.3	21.8	12.0	18.9
PCL (Ar + C ₂ H ₃ COOH)	57.1	5.5	16.3	21.1

Nanovláknina z SiO₂ - výsledky:

Na obr. č. 42 jsou fotoelektronová spektra vzorků SiO₂ změřená v oboru vazebných energií 0 - 1000 eV, na obr. č. 43 je detail těchto spekter v oboru vazebných energií 0 - 500 eV.

Obr. 42 – Spektra vzorků SiO₂ měřená v oboru vazebných energií 0 – 1000 eV



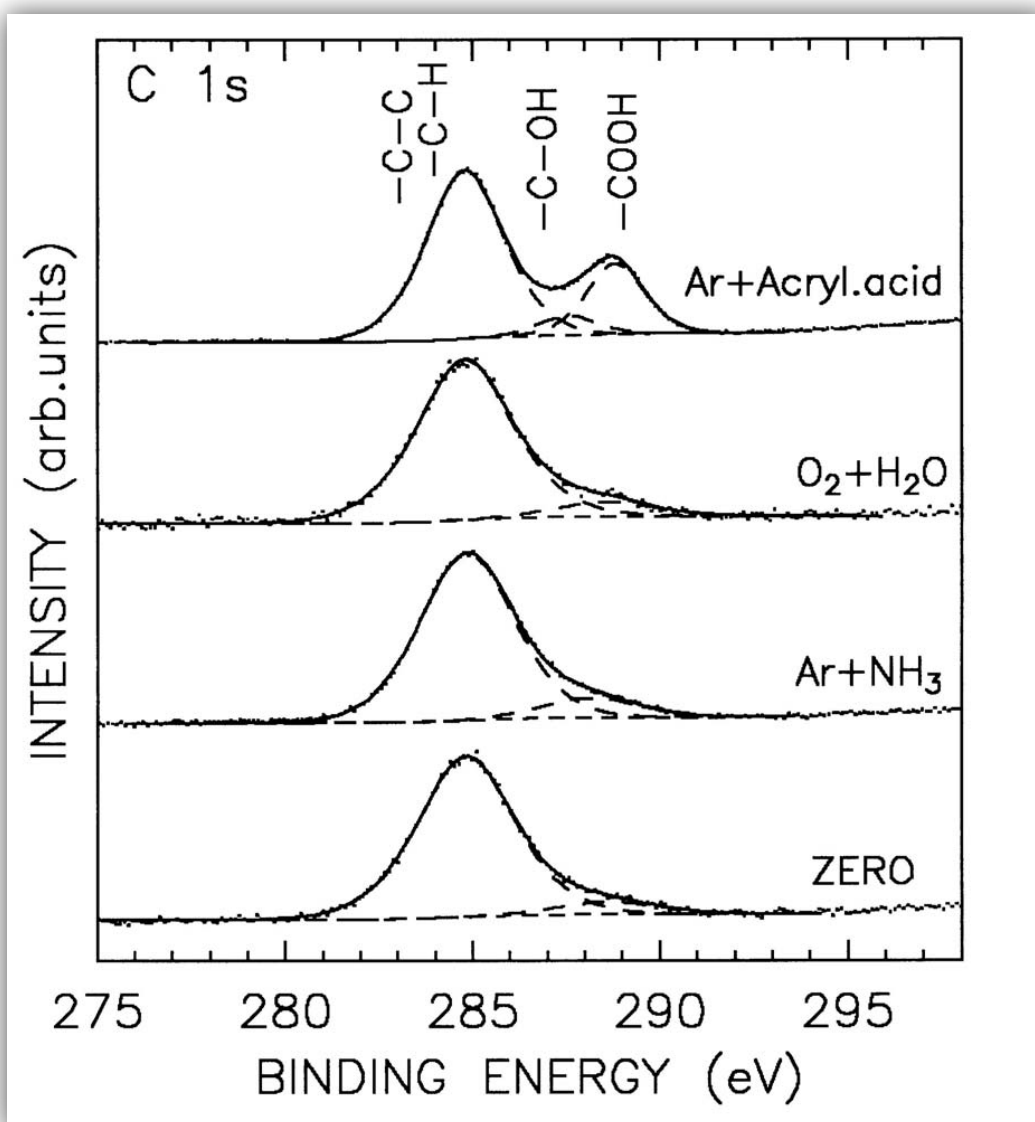
Obr. 43 - Spektra vzorků SiO₂ měřená v oboru vazebních energií 0 – 500 eV
(vyexpandovaná část spekter z obr. č. 42)

Z integrálních intenzit jednotlivých fotoemisních linií, změřených při vysokém rozlišení, byly vypočteny za předpokladu homogenního vzorku hodnoty atomárních koncentrací identifikovaných prvků, které jsou uvedeny v tabulce č. 6.



Tabulka č. 6: Povrchové atomární koncentrace prvků vzorků nanovláken SiO_2

Prvek	C	O	Si	N
Vzorek				
SiO_2 (zero sample)	17.0	55.0	28.0	-
SiO_2 (Ar + NH_3)	15.8	54.8	28.4	1.0
SiO_2 (O_2 + H_2O)	9.9	59.8	30.2	0.1
SiO_2 (Ar + $\text{C}_2\text{H}_3\text{COOH}$)	64.0	36.0	0.0	0.0



Obr. 44 – Spektra C 1s fotoelektronů ze vzorků SiO_2 (spektra jsou normovaná na stejnou výšku)



4.4 Diskuze výsledků funkcionalizace nanovláknenných materiálů

Optimalizace procesních parametrů funkcionalizace:

Na obrázcích 16a a 17a jsou zobrazena nemodifikovaná nanovláknena z PVA a z PCL. Na následujících obrázcích 16b a 17b je vidět degradace nanovláken po funkcionalizaci v procesním plynu O_2 . Oba použité typy nanovláken degradovaly i po funkcionalizaci ve vzduchu, jak lze vidět na obr. č. 15a a 15b. Jedním z možných důvodů této degradace materiálu je, že v průběhu plazmové modifikace vzniká příliš silný iontový bombard z plazmového výboje, který narušuje povrchovou strukturu nanovláknenného materiálu do takové míry, že dochází k jeho degradaci. Tato degradace navíc může být podpořena účinkem UV záření vznikajícím v plazmatu.

Při použití procesních parametrů s nejnižšími hodnotami (snižování výkonu MW zdroje) sice docházelo k viditelnému snížení degradace nanovláken, ale dle zkušeností s předchozími experimenty hydrofilizace polymerních materiálů se dá předpokládat, že tyto parametry nejsou pro úspěšnou funkcionalizaci dostatečné.

Po funkcionalizaci při nejvyšších hodnotách procesních parametrů (doba funkcionalizace byla 60 sekund a výkon MW zdroje 100 %) se kapka vsákla ihned po nanesení na povrch nanovláknena z PCL. Ale jak bylo již dříve uvedeno, takto modifikovaný materiál je degradován.

Při použití procesních parametrů s nejnižšími hodnotami (doba funkcionalizace byla 15 sekund a výkon MW zdroje 40 %) se kapka postupně začala vsakovat až po zhruba 15 sekund od nanesení. Z toho lze usuzovat, že přestože byla snížena degradace materiálu, je snížena i účinnost funkcionalizace.

Na základě získaných výsledků byla provedena optimalizace procesních parametrů a úprava použitých procesních plynů dle odborné literatury.

Orientační kapkový test – ověření účinnosti funkcionalizace

Po zhodnocení výsledků prvotních experimentů funkcionalizace nanovláken s ohledem na předchozí zkušenosti s funkcionalizací polymerních materiálů s využitím hydroxylových ($-OH$) funkčních skupin byl proces modifikace upraven. Jako pracovní plyn byl použit O_2 v kombinaci s parami H_2O po dobu 60 sekund.



Na obrázku č. 19 můžeme pozorovat, že kapková metoda provedená na modifikovaném materiálu z PCL ukazuje na dobrou účinnost funkcionalizace, protože se po nanesení na materiál kapka ihned vsákla do jeho povrchu. Podle následujícího obrázku č. 20 lze usoudit, že nanovláknenný materiál z PVA i z PCL modifikovaný ve směsi O_2 s H_2O nevykazoval také žádnou degradaci.

V následujícím procesu (viz obr. č. 21) byla použita směs Ar a kyseliny akrylové (C_2H_3COOH), aby došlo k navázání karboxylových ($-COOH$) skupin na povrch nanovláken. I zde můžeme pozorovat, že provedení kapkového testu vykazuje dobrou účinnost funkcionalizace povrchu nanovláknenných materiálů - kapka se totiž vsákla do materiálu ihned po nanesení. Navíc zpracovaný materiál nevykazoval po procesu modifikace opět žádnou degradaci (viz obr. č. 22).

Po procesu navázání aminových (NH_2) funkčních skupin pomocí směsi Ar a NH_3 byl také proveden orientační kapkový test na nanovláknenném materiálu – test opět vykazoval dobrou účinnost provedené plazmové modifikace (viz obr. č. 23). Také po této funkcionalizaci provedené ve směsi Ar a NH_3 nebyla na nanovláknenných materiálech patrná žádná degradace, viz obr. č. 24.

Analýza SEM:

Na následujících obrázcích jsou vidět nanovláknena z PVA (obráz. č. 26) a nanovláknena z PCL (obráz. č. 27) po funkcionalizaci v O_2 s parami H_2O . Vláknena nevykazují známky degradace.

Na obrázcích č. 28 a č. 29 můžeme pozorovat, že nanovláknena z PVA i z PCL po funkcionalizaci ve směsi Ar s NH_3 opět nevykazují žádné známky degradace materiálu. Obrázky č. 30 a č. 31 prokazují, že oba typy použitých nanovláken z PVA i z PCL po funkcionalizaci ve směsi Ar a kyseliny akrylové také nevykazovaly žádnou degradaci.

Na obr. č. 32 lze vidět nanovláknena z SiO_2 po funkcionalizaci pouze v O_2 po dobu 60 sekund. Vzhledem k tomu, že na obrázku není patrné poškození nanovláken, lze předpokládat, že nanovláknena z SiO_2 nebudou po uvedených funkcionalizacích také degradovat.

Celkové výsledky prokazují úspěšný proces optimalizace procesních parametrů a jejich vhodné zvolení pro experiment.



Analýza ESCA

Nanovlákná PVA:

S výjimkou Zero sample (nanovláknenný materiál z PVA ve výchozím stavu) byl v testovaných vzorcích uhlík přítomen ve třech chemických stavech (viz spektra na obr. č. 36.), jejichž populace jsou uvedeny v tabulce č. 3. Z tabulky č. 3 je patrné, že funkcionizace nanovláken PVA za použití směsi pracovního plynu O_2 s parami H_2O je vhodná pro navázání funkčních skupin C-O- (což s největší pravděpodobností odpovídá požadovaným skupinám C-OH, jak naznačuje spektrum na obr. 36). Populace funkčních skupin C-O- vzrostla o 7 % ve srovnání s materiálem nefunkcionalizovaným. Populace funkčních C-OO- (to může odpovídat požadovaným skupinám C-OOH, viz spektrum na obr. 36) vzrostla o 3 %. Úspěšná byla i funkcionizace ve směsi Ar a C_2H_3COOH , kdy byl zaznamenán nárůst funkční skupiny C-OO- o 9 %.

Ze spekter na obr. č. 34 je zřejmé, že koncentrace dusíku v měřených vzorcích byla tak nízká, že linie N 1s elektronů, která by se měla nacházet u hodnoty ~ 400 eV, není v těchto spektrech vždy patrná a jejich změření s dostatečně velkým rozlišením vyžadovalo časově náročnou akumulaci signálu. Na obr. č. 35 můžeme pozorovat vyexpandovanou část spekter z obr. č. 34 v oboru vazebních energií 0 – 280 eV. Křivky jsou ve stejném pořadí jako na obr. č. 34.

Jak je vidět z tabulky č. 2, koncentrace dusíku, pokud byl přítomen, byla u testovaných vzorků nízká a srovnatelná s jeho koncentrací u výchozího, nemodifikovaného vzorku (zero sample). Funkcionizace nanovláken PVA ve směsi Ar a NH_3 nebyla úspěšná. Může to být způsobeno chemickým složením testovaného materiálu, případně by bylo potřeba zvolit jinou pracovní směs. To může být námětem pro provedení dalšího výzkumu.

Vazebná energie S $2p_{3/2}$ elektronů (168.8 eV) je konsistentní s hodnotami uvedenými v literatuře [53] pro $-SO_3$ resp. $-SO_4$ funkční skupiny, vazebná energie P 2p elektronů (134.2 eV) v hodnotě změřené pro $-PO_3$ resp. $-PO_4$ skupiny, ale též u některých fosfazenů [53, 54], viz obr. č. 37 a č. 38.



Nanovláknna PCL:

Na obrázku č. 39 můžeme pozorovat spektra v oboru vazebních energií 0 – 1000 eV. Na následujícím obrázku č. 40 se nachází vyexpandovaná část spekter z obr. č. 39 v oboru vazebních energií 0 – 280 eV. Můžeme pozorovat, že na rozdíl od vzorků z PVA neobsahuje žádný ze vzorků z PCL v povrchové vrstvě síru. Povrchové atomární koncentrace všech přítomných prvků jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Výsledky uvedené v tabulce č. 4 ukazují, že na rozdíl od nanovláken PVA po funkcionalizaci nanovláken PCL ve směsi O_2 a H_2O nedošlo k nárůstu kyslíku. Spektra C 1s fotoelektronů jsou u vzorků PCL poněkud komplikovaná v důsledku přítomnosti čtyř chemických stavů uhlíku již ve výchozím polymeru, a proto výsledky získané jejich fitováním (viz tabulka č. 5 a obr. č. 41) jsou s výjimkou komponenty, náležející dobře separované karboxylové skupině, méně spolehlivé. Nicméně tyto výsledky ukazují, že po funkcionalizaci nanovláken PCL ve směsi Ar a C_2H_3COOH vedla ke zvýšení funkčních skupin C-OO- (resp. C-OOH) o 10 %.

Po funkcionalizaci nanovláken PVA za použití pracovní směsi Ar a NH_3 můžeme pozorovat nárůst přítomnosti dusíku (viz tab. 4).

Vazebná energie N 1s elektronů, změřená u vzorku z PCL funkcionalizovaném ve směsi Ar a NH_3 (399.8 eV) je v literatuře [53, 55] přisuzována vazebné konfiguraci – C- NH_2 příp. též O=C-N-, -N-CO-N- a -CN.

Nanovláknna SiO_2 :

Na obrázku č. 42 můžeme pozorovat spektra v oboru vazebních energií 0 – 1000 eV. Na následujícím obrázku č. 43 se nachází vyexpandovaná část spekter z obr. č. 42 v oboru vazebních energií 0 – 500 eV. Ve vysokém rozlišení byly změřeny linie C1s, O 1s, Si 2p a N 1s fotoelektronů. Hodnoty povrchové atomární koncentrace prvků jsou následně uvedeny v tabulce č. 6.

Na obr. č. 44 můžeme pozorovat, že s výjimkou vzorku SiO_2 , funkcionalizovaného ve směsi Ar a kyseliny akrylové (C_2H_3COOH), dominovala ve spektrech C 1s elektronů komponenta, náležející –C-C a resp. –C-H vazbám. Přítomnost uhlíku byla zjištěna již u vzorku nanovláken SiO_2 , který nebyl



funkcionalizován (Zero sample). To ukazuje na kontaminaci základního materiálu uhlíkem.

U vzorku SiO_2 ($\text{Ar} + \text{C}_2\text{H}_3\text{COOH}$) je přítomná i komponenta náležející karboxylovým skupinám, ve spektru ale nejsou vidět linie Si 2p elektronů, a to zřejmě v důsledku pokrytí povrchu vrstvou polymerního materiálu. Vzhledem k tomu, že pro oblast kinetických energií vzorků SiO_2 , ve kterých se nacházejí měřená spektra, činí (vypočtena z rovnice [52] TPP-2M) $\lambda \sim 2.57$ nm. Informace, získané touto analýzou, se týkají povrchové vrstvy o tloušťce přibližně 5 – 6 nm. To ukazuje, že polymerní vrstva vytvořená během funkcionalizace ve směsi Ar a $\text{C}_2\text{H}_3\text{COOH}$ má větší tloušťku než je tloušťka povrchové analyzované vrstvy, tedy 6 nm.

4.5 Sterilizace nanovláknenných materiálů

4.5.1 Příprava vzorků pro sterilizaci

Pro sterilizaci nanovláken byla naočkována bakterie *Escherichia Coli* – jedná se o gramnegativní bakterii tyčinkovitého tvaru z bakteriálního kmene dle CCM 2024. Dále byla naočkována bakterie *Staphylococcus Aureus* – jedná se o grampozitivní bakterii kokovitého (kulovitého) tvaru z bakteriálního kmene dle CCM 299.

Pro sterilizaci byly vybrány nanovláknenné materiály PVA (organický materiál) a SiO_2 (anorganický materiál).

Na vzorky PVA byl nanesen 1 ml bakteriálního inokula o koncentraci 10^5 CFU/ml – 100 000 kolonií v 1ml roztoku. Na vzorky SiO_2 bylo nanесeno 0,5 ml bakteriálního inokula o koncentraci 10^5 CFU/ ml. Vzorky byly uloženy v Petriho miskách a po sterilizaci byly zpět ukládány do biologických kontejnerů (viz obr. č. 45).



Obr. 45 – Petriho misky se vzorky SiO_2 a prázdné kontejnery před sterilizací



4.5.2 Optimalizace procesních parametrů sterilizace

Na základě odborné rešerše a dostupnosti byly zvoleny procesní plyny a parametry pro sterilizaci nanovláken PVA a SiO₂. Zvolené procesní parametry jsou uvedeny v tabulce č. 7. Výkon MW zdroje byl nastaven na 1kW, průtok procesního plynu byl 100 sccm. I přesto, že byla sterilizace prováděna v samotných procesních plynech jako např. v O₂ nebo vzduchu, nedocházelo k degradaci nanovláken zřejmě vlivem přítomného fyziologického roztoku.

Tabulka č. 7: Procesní parametry sterilizace

-	STERILIZACE BAKTERIÍ					
	<i>Escherichia coli</i>			<i>Staphylococcus Aureus</i>		
Materiál	Nosný plyn, čas sterilizace [s]			Nosný plyn, čas sterilizace [s]		
PVA	Ar	O ₂	Vzduch	Ar	O ₂	Vzduch
	15	15	15	15	15	15
	30	30	30	30	30	30
	60	60	60	60	60	60
SiO ₂	Ar	O ₂	Vzduch	Ar	O ₂	Vzduch
	15	15	15	15	15	15
	30	30	30	30	30	30
	60	60	60	60	60	60



4.5.3 Testy sterilizace

Pro hodnocení nanovláken PVA byla použita kvantitativní norma neboli kvantitativní hodnocení počtu znovu obnovených bakteriálních kolonií – konkrétně podle AATCC Test method 100 – 2004 – Antibacterial activity Assessment of Textile materials, pro hodnocení nanovláken SiO₂ byla použita kvantitativní norma AATCC Test method 100 – An American standard 1993.

Postup testování bakterií

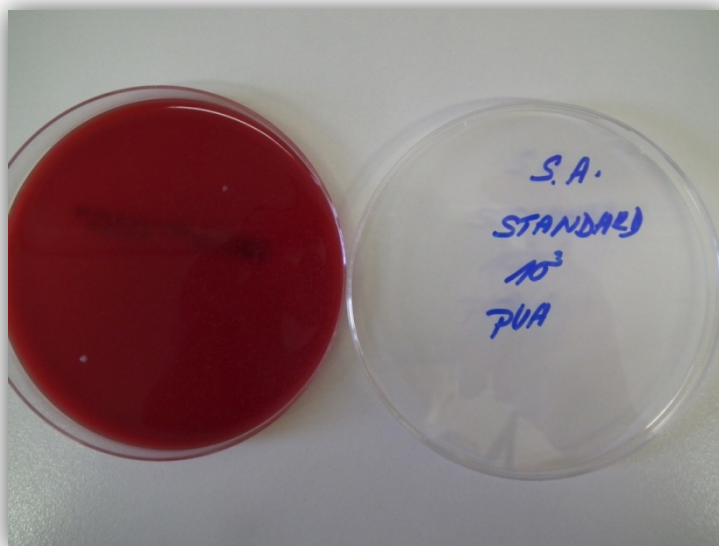
1. Připravené vzorky byly sterilizovány podle zvolených procesních parametrů. Sterilizované vzorky byly vloženy do kontejnerů.
2. Do kontejnerů bylo přidáno 10 ml fyziologického roztoku, čímž bylo ředění bakterií upraveno na 10³ CFU/ml.
3. Kontejnery byly protřepány (vortexovány) po dobu 5 minut.
4. Z každého kontejneru byl odebrán 1 ml bakteriologického média, které bylo vyočkováno na Petriho misku s krevním agarem.
5. Misky byly umístěny do termostatu a inkubovány 24 hodin při teplotě 36,5 °C.

Inkubace byla provedena na sterilním krevním agaru (Columbia agar) – zakoupeno od firmy BIO-RAD. Oba bakteriální kmeny jsou referenční kultury mikroorganismů (dle ALE-G18, ČSNI) zakoupeny z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

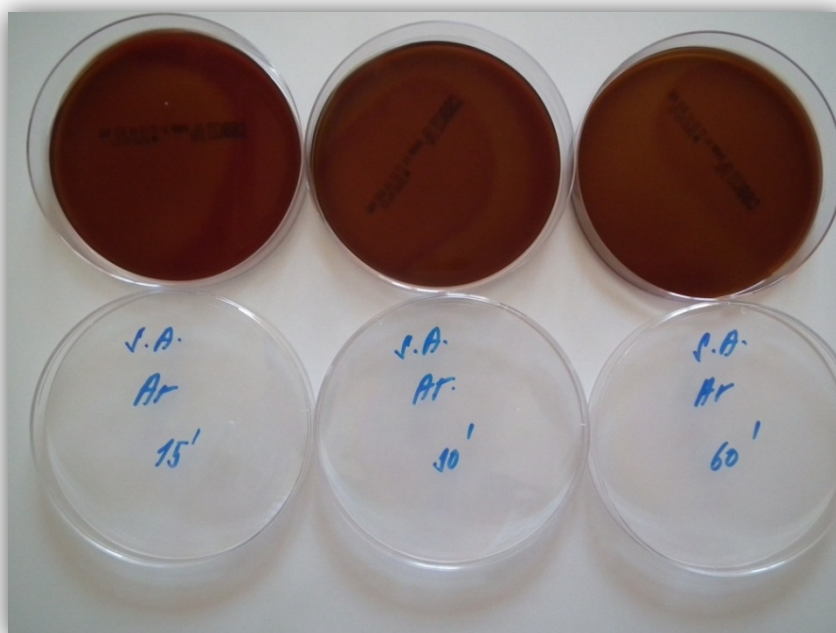


4.5.4 Sterilizace nanovláken PVA – výsledky

Na následujícím obr. č. 46 je přiložen standard *S. aureus* – neboli odebrané bakteriologické médium *S. aureus* ze vzorku, který byl pouze naočkován a nebyl sterilizován. Na obr. č. 47 – 49 jsou výsledky sterilizace s různými procesními plyny.

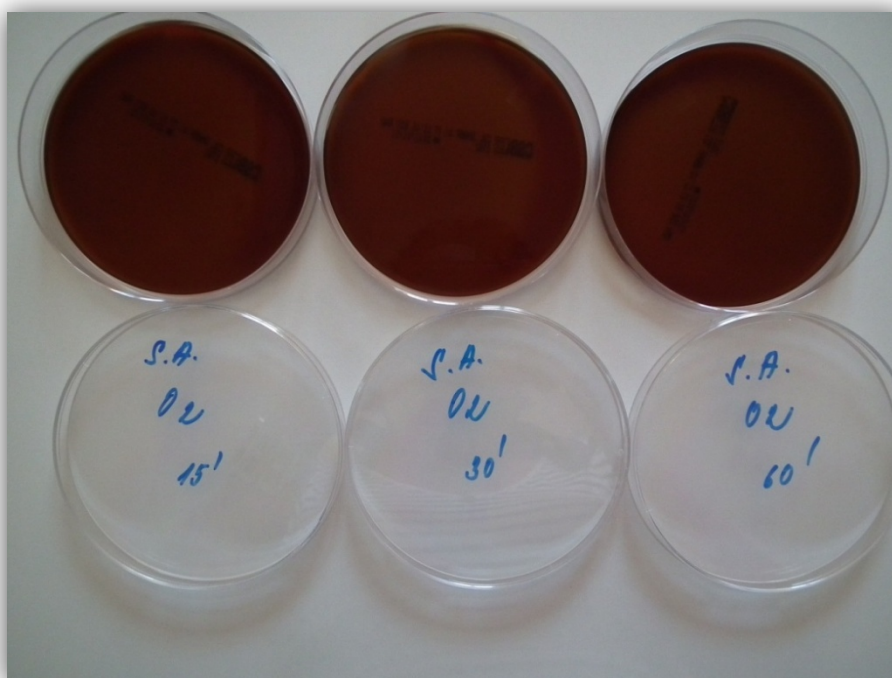


Obr. 46 – Viditelné 2 velké a tisíce drobných bakteriálních kolonií *S. aureus*



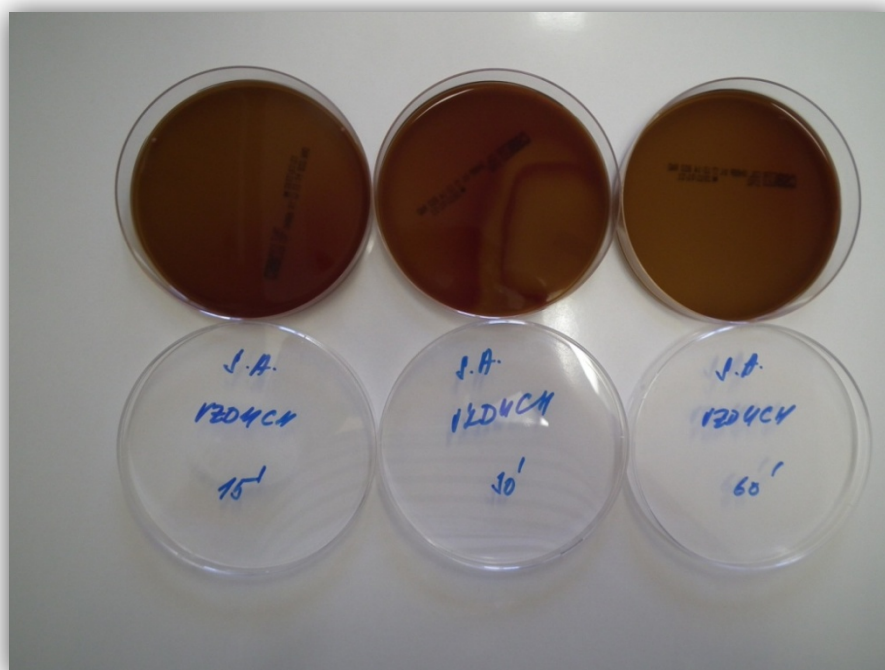
PVA - sterilizováno v Ar	standard	15s	30s	60s
<i>S. aureus</i>	tisíce kolonií	1 kolonie	0 kolonií	0 kolonií

Obr. 47 – Viditelná 1 bakteriální kolonie *S. aureus* (sterilizace v Ar, 15s)



PVA - sterilizováno v O ₂	standard	15s	30s	60s
S. aureus	tisíce kolonií	1 kolonie	0 kolonií	0 kolonií

Obr. 48 - Viditelná 1 bakteriální kolonie S. aureus (sterilizace v O₂, 15s)

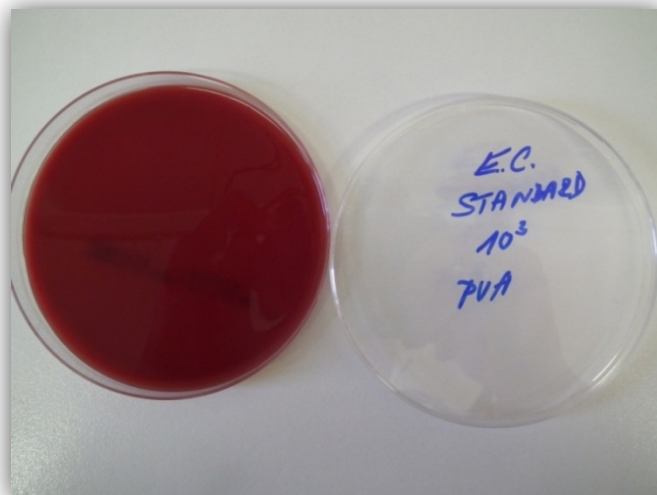


PVA - sterilizováno ve vzduchu	standard	15s	30s	60s
S. aureus	tisíce kolonií	2 kolonie	0 kolonií	0 kolonií

Obr. 49 – Viditelné 2 bakteriální kolonie S. aureus (sterilizace ve vzduchu, 15s)



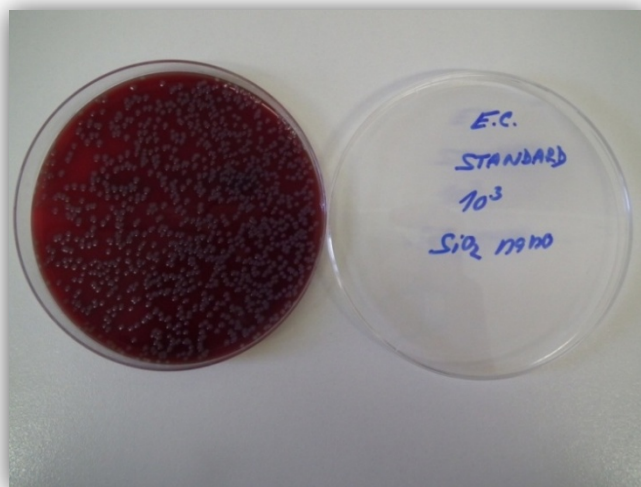
Na následujícím obrázku č. 50 je přiložen standard E. coli - odebrané bakteriologické médium E. coli ze vzorku nanovláken PVA, který byl naočkován a nebyl sterilizován.



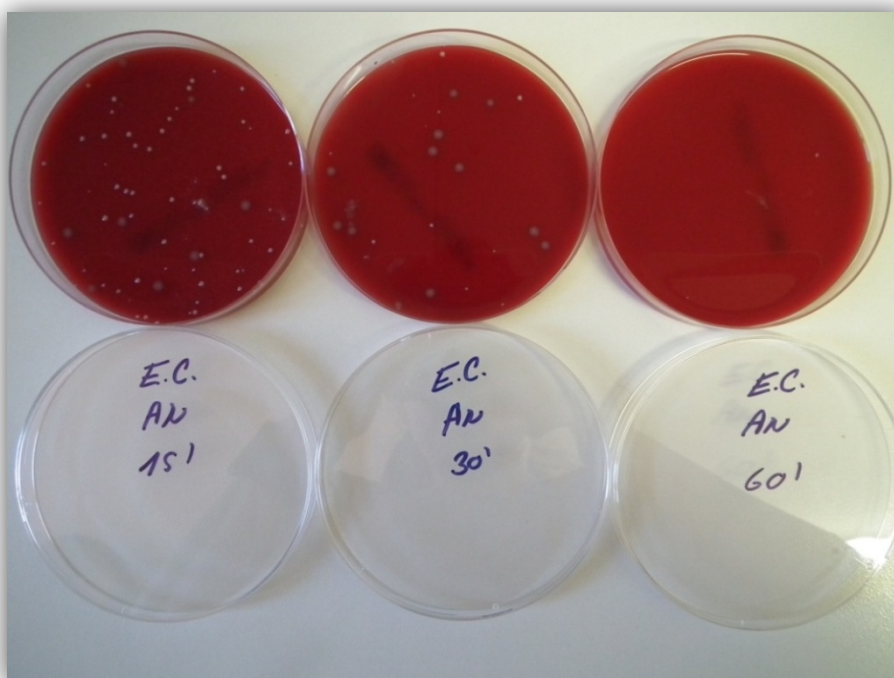
Obr. 50 – 0 přítomných bakteriálních kolonií E. coli (100 % inhibiční efekt)

4.5.5 Sterilizace nanovláken SiO₂ - výsledky

Na obrázku č. 51 je přiložen standard E. coli - odebrané bakteriologické médium E. coli ze vzorku nanovláken SiO₂, který byl naočkován a nebyl sterilizován. Na obr. č. 52 – 54 jsou výsledky sterilizace s různými procesními plyny.

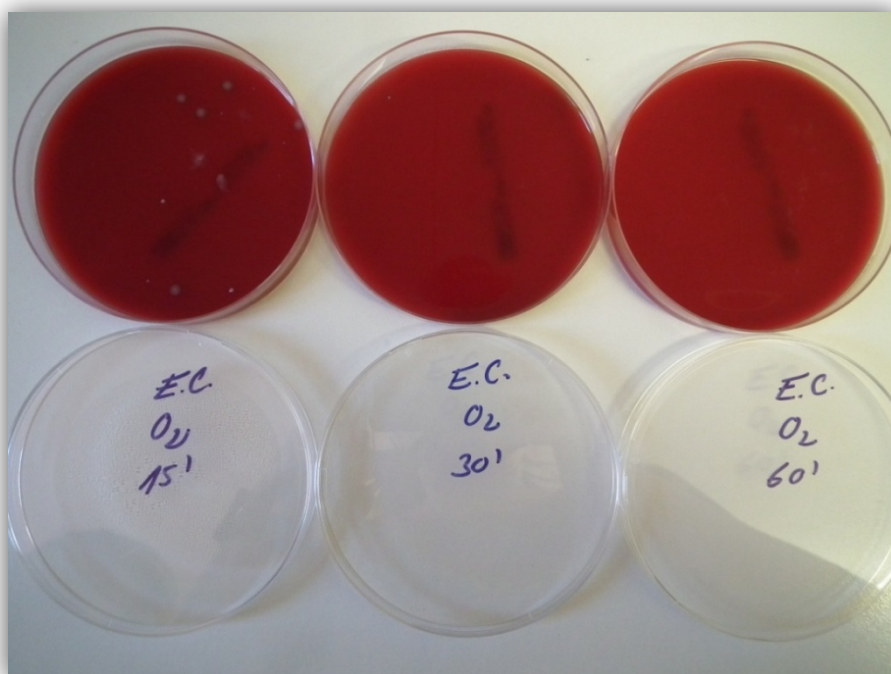


Obr. 51 – Viditelný kompaktní růst bakteriálních kolonií



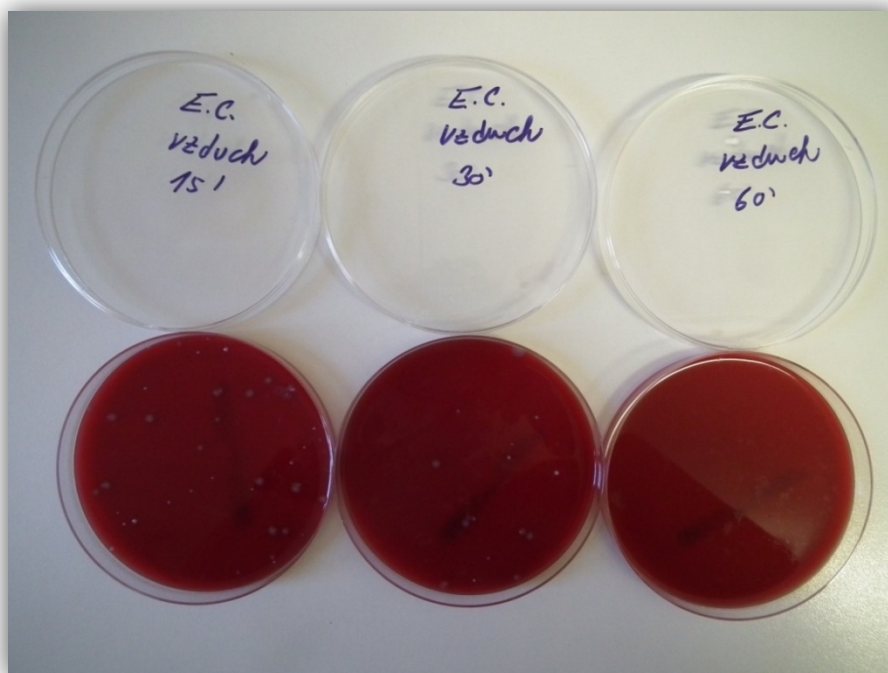
SiO ₂ - sterilizováno v Ar	standard	15s	30s	60s
E.coli	tisíce kolonií	45 kolonií	31 kolonií	2 kolonie

Obr. 52 – Přítomnost bakteriálních kolonií E. coli po sterilizaci v Ar



SiO ₂ - sterilizováno v O ₂	standard	15s	30s	60s
E.coli	tisíce kolonií	15 kolonií	1 kolonie	0 kolonií

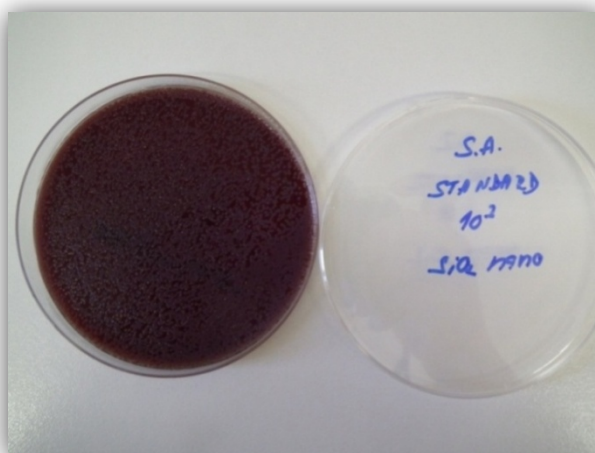
Obr. 53 - Přítomnost bakteriálních kolonií E. coli po sterilizaci v O₂



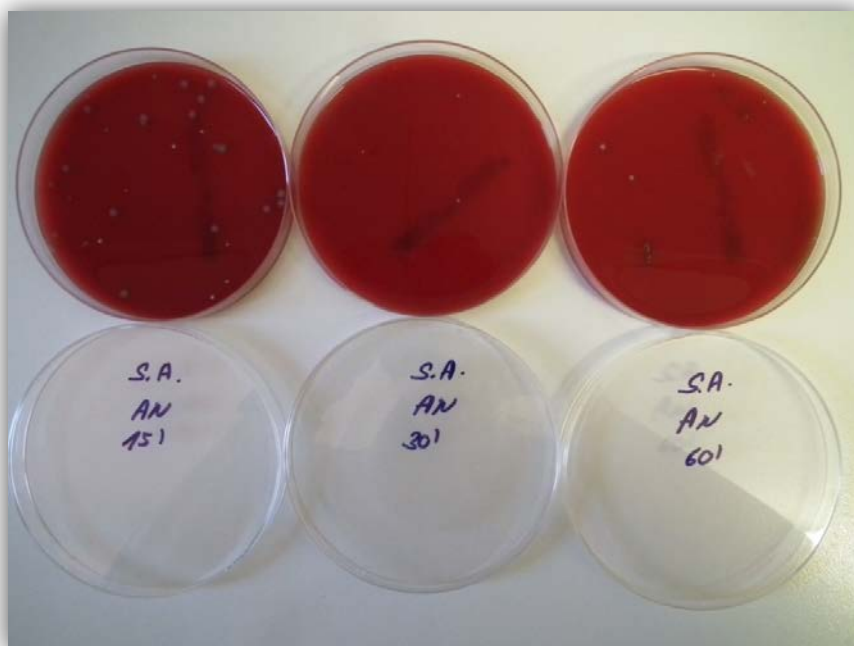
SiO ₂ - sterilizováno ve vzduchu	standard	15s	30s	60s
E.coli	tisíce kolonií	44 kolonií	19 kolonií	0 kolonií

Obr. 54 - Přítomnost bakteriálních kolonií E. coli po sterilizaci ve vzduchu

Na následujícím obr. č. 55 je přiložen standard S. aureus - odebrané bakteriologické médium S. aureus ze vzorku nanovláken SiO₂, který byl naočkován a nebyl sterilizován.

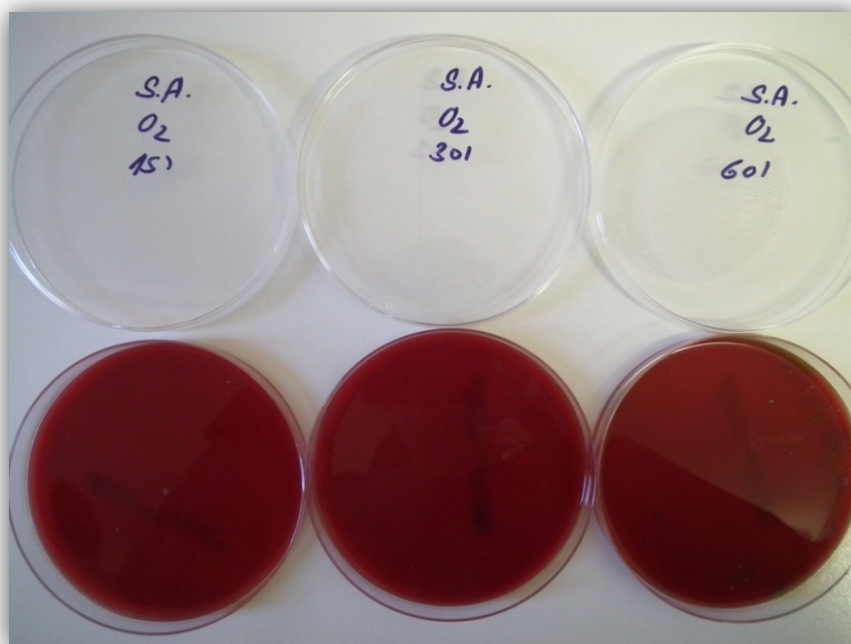


Obr. 55 – Viditelný kompaktní růst bakteriálních kolonií S. aureus



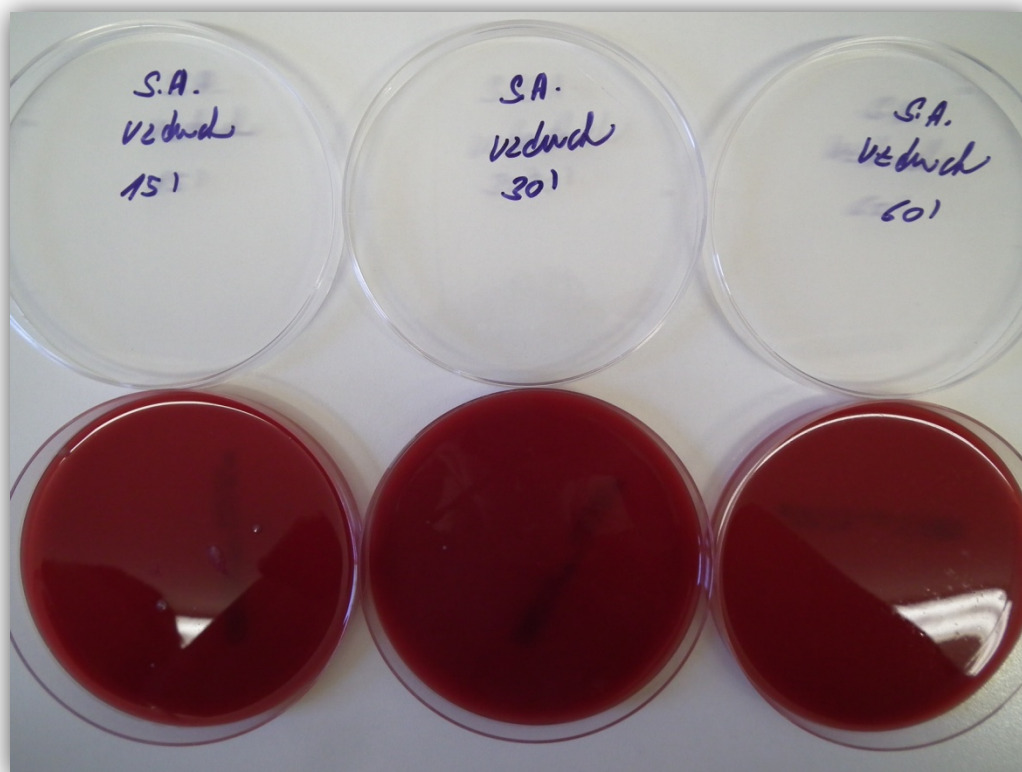
SiO ₂ - sterilizováno v Ar	standard	15s	30s	60s
S. aureus	tisíce kolonií	31 kolonií	4 kolonie	8 kolonií

Obr. 56 - Přítomnost bakteriálních kolonií S. aureus po sterilizaci v Ar



SiO ₂ - sterilizováno v O ₂	standard	15s	30s	60s
S. aureus	tisíce kolonií	3 kolonie	1 kolonie	30 kolonií

Obr. 57 - Přítomnost bakteriálních kolonií S. aureus po sterilizaci v O₂



SiO ₂ - sterilizováno ve vzduchu	standard	15s	30s	60s
S. aureus	tisíce kolonií	4 kolonie	2 kolonie	0 kolonií

Obr. 58 - Přítomnost bakteriálních kolonií S. aureus po sterilizaci ve vzduchu

4.6 Diskuze výsledků sterilizace

Sterilizace nanovláken PVA (S. aureus):

Na obrázku č. 46 je vyočkován standard S. aureus z nanovláken z PVA. Můžeme pozorovat 2 velké a tisíce drobných malých bakteriálních kolonií S. aureus. Na dalším obr. č. 47 lze vidět 1 bakteriální kolonii S. aureus po 15 sekundách plazmování v Ar. Ostatní krevní agary (sterilizace 30 a 60 sekund) nevykazovaly žádnou další přítomnost bakteriálních kolonií. Na obr. č. 48 můžeme pozorovat podobný případ – opět 1 viditelná bakteriální kolonie S. aureus po 15 sekundách plazmování v O₂. Zbylé krevní agary (sterilizace 30 a 60 sekund) byly čisté. Na obr. č. 49 lze vidět 2 bakteriální kolonie S. aureus po 15 sekundách plazmování ve vzduchu. Další krevní agary (sterilizace 30 a 60 sekund) byly čisté.



Na obrázku č. 50 můžeme pozorovat standard *E. coli*. Krevní agar je úplně čistý, lze tedy usoudit, že nanovláknový materiál z PVA má samostatnou schopnost 100% inhibovat bakteriální kolonie *E. coli*. Vzhledem k těmto skutečnostem nebyly již dále prováděny experimenty na sterilizaci bakterie *E. coli*.

Z výsledků tedy jednoznačně vyplývá, že 15 sekund sterilizace nanovláken z PVA v plazmatu při použití procesních plynů jako Ar, O₂ a vzduchu stačí k 100 % inhibici bakteriálních kolonií *S. aureus*.

Inhibice bakteriálních kolonií probíhá především díky působení volných radikálů v plazmatu. Tyto radikály jsou vysoce reaktivní, a proto při vystavení mikroorganismů těmto radikálům dochází k různým efektům, které způsobují strukturní a funkční poškození komponentů buněk včetně proteinů, lipidů a nukleových kyselin. To může vést ke smrti bakterií [5]. Další sterilizační účinek má UV záření vznikající v plazmatu [9].

Sterilizace nanovláken SiO₂ (*E. coli*):

Na obrázku č. 51 je vyočkován standard bakterie *E. coli*, který byl získán z nesterilizovaných nanovláken SiO₂. Pouhým okem lze pozorovat kompaktní růst bakteriálních kolonií *E. coli*. Počet bakteriálních kolonií lze odhadnout řádově v tisících.

Při modifikaci nanovláken SiO₂ v Ar (viz obr. č. 52) bylo po 15 sekundách plazmování stále přítomno 45 bakteriálních kolonií *E. coli*, po 30 sekundách to bylo 31 bakteriálních kolonií a po 60 sekundách zůstaly přítomny 2 bakteriální kolonie.

Na následujícím obrázku č. 53 lze vidět zřetelný rozdíl účinnosti procesu sterilizace díky použití O₂ jako procesního plynu oproti Ar. Vysvětlením může být tvoření více volných radikálů v O₂ než v Ar, takže dojde k účinnější inhibici bakterií než v procesním plynu Ar. Po 15 sekundách plazmování bylo přítomno stále 15 bakteriálních kolonií *E. coli*, po 30 sekundách to byla 1 bakteriální kolonie a poslední krevní agar po sterilizaci po dobu 60 sekund nevykazoval žádnou přítomnost bakteriálních kolonií.

Následující sterilizace nanovláken SiO₂ vzduchem nebyla již tak účinná jako předchozí sterilizace v O₂ (viz obr. č. 54), protože inhibiční účinek se neprojevil tak rychle. Po 15 sekundách plazmování ve vzduchu bylo viditelných stále 44 bakteriálních



kolonií *E. coli*, po 30 sekundách to bylo 19 bakteriálních kolonií a poslední sterilizace po 60 sekundách byla úplná.

Sterilizace nanovláken SiO_2 (*S. aureus*):

Na obr. č. 55 je přiložen standard *S. aureus* a lze pozorovat kompaktní růst bakterií. Počet bakterií se pohybuje řádově v tisících. U obr. č. 56 můžeme pozorovat výsledek sterilizace v procesním plynu Ar. Po 15 sekundách sterilizace v Ar bylo viditelných stále 31 bakteriálních kolonií *S. aureus*, po 30 sekundách to byly 4 bakteriální kolonie a po 60 sekundách sterilizace bylo přítomných 8 kolonií. Tento výsledek může být způsoben chybou lidského faktoru, kdy při vyndávání sterilizovaného vzorku z aparatury došlo ke kontaminaci s odstíněnou částí vzorku. I přesto tento výsledek naznačuje úspěšnost tohoto sterilizačního procesu.

Na obr. č. 57 lze pozorovat skokový nárůst bakteriálních kolonií *S. aureus* (30 kolonií) při nejdelší modifikaci v O_2 (60s). Tento výsledek je způsoben zřejmě špatným nastavením tlaku (sterilizace po dobu 60 sekund byla testována jako první), kdy po zapálení plazmového výboje došlo k prudkému poklesu tlaku v recipientu a tím pádem k ovlivnění intenzity plazmatu a tedy účinnosti sterilizace. Po 15 sekundách sterilizace v O_2 byly zřetelné 3 bakteriální kolonie *S. aureus*, po 30 sekundách to byla 1 bakteriální kolonie. Obr. č. 58 ukazuje výsledky přítomnosti bakteriálních kolonií *S. aureus* po sterilizaci ve vzduchu. Po 15 sekundách sterilizace byly v krevním agaru zachyceny 4 bakteriální kolonie *S. aureus*, po 30 sekundách to byly 2 bakteriální kolonie a po 60 sekundách sterilizace byl krevní agar čistý.

U výsledků nanovláken z SiO_2 lze závěrem konstatovat, že u sterilizačního procesu vzduchem a O_2 postačuje 60 sekund k 100 % inhibici obou bakteriálních kmenů. U sterilizování v O_2 při 60 sekundách došlo k chybě nastavení tlaku aparatury.

Při použití procesního plynu Ar se po 60 sekundách sterilizace vyskytují stále u obou bakteriálních kmenů jednotlivé bakteriální kolonie ve velmi nízkém počtu. Zde by byla potřeba k 100 % inhibici bakteriálních kmenů časy sterilizace o 10 – 15 sekund prodloužit. I v tomto případě je inhibiční účinek způsoben kombinací volných reaktivních radikálů a UV záření v plazmatu.



5 Závěr

- Byla provedena úspěšná optimalizace procesních parametrů funkcionalizace, aby nedocházelo k degradaci nanovláken a funkcionalizace byla účinná.
- U nanovláken z PVA bylo patrné účinné navázání funkčních skupin C-O- (resp. C-OH), nejúčinnější bylo navázání skupin COO- (resp. -COOH) o 10 at. % vůči materiálu ve výchozím stavu. Nebylo prokázáno navázání funkčních skupin NH₂. U nanovláken z PCL bylo prokázáno nejúčinnější navázání funkčních skupin COO- o 10 at. % vůči materiálu ve výchozím stavu. Byly prokázány i další požadované skupiny. U nanovláken z SiO₂ bylo prokázáno účinné navázání všech funkčních skupin C-O-, C=O- a NH₂.
- Bylo prokázáno, že k 100% inhibici bakteriálních kolonií *Staphylococcus aureus* na nanovlákních z PVA stačí 15 sekund plazmování v procesních plynech Ar, O₂ a vzduchu. Nanovláknenný materiál z PVA má schopnost samostatně inhibovat bakteriální kolonie *Escherichia coli*.
- Vzhledem k tomu, že nanovláknenný materiál PVA neumožňuje růst bakteriálních kolonií *E. Coli* ještě před provedením sterilizace, doporučil bych jeho další výzkum s použitím nanočástic Ag, jako základu pro kompozitní materiál textilie, protože je známo, že nanočástice Ag mají také antibakteriální účinky. To by se mohlo stát tématem pro další diplomovou nebo disertační práci.
- Bylo prokázáno, že ke 100% inhibici bakteriálních kolonií *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* na nanovlákních SiO₂ stačí 60 sekund plazmování v procesních plynech O₂ a vzduchu. U procesního plynu Ar doporučuji pro 100% inhibici obou bakteriálních kmenů proces sterilizace prodloužit o 15 sekund.



6 Seznam použité literatury

[1] KOLOUCH, A. *Aplikace plazmových výbojů pro úpravy a zušlechťování povrchů*. Liberec, 2004. Disertační práce. Technická univerzita v Liberci.

[2] VACKOVÁ, T. *Depozice tenkých vrstev TiO₂ metodou PECVD*. Liberec, 2004. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci.

[3] BRUCHANOV, M. *Fyzikální metody v medicíně II*. [online]. 2005 [cit. 2012-05]. Dostupné z: http://bruxy.regnet.cz/fel/02FM1/plazmova_sterilizace.pdf

[4] *Nanocon 2009* [online]. 2009[cit. 2012-05]. ISBN 978-80-87294-12-3. Dostupné z: <http://www.csnmt.cz/getfile.php?type=file&IDfile=87>

[5] MCDONNELL, Gerald E. *Antisepsis, disinfection, and sterilization: types, action, and resistance*. Washington, D.C.: ASM Press, c2007, xv, 361 p. ISBN 15-558-1392-5.

[6] BÍLEK, F. *Příprava bioaktivních povrchů pomocí fyzikálně - chemických metod a jejich aplikace*. Zlín, 2006. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.

[7] KULHÁNEK, Petr. *Úvod do teorie plazmatu*. Vyd. 1. Praha: AGA, 2011, 375 s. ISBN 978-809-0458-222.

[8] [online]. [cit. 2012-04]. Dostupné z: http://www.nasa.gov/mission_pages/themis/auroras/sun_earth_connect.html

[9] KNIŽÁTKOVÁ, E. *Využití radiofrekvenčního a nízkofrekvenčního plazmatu pro sterilizaci*. Brno, 2010. Diplomová práce. Masarykova univerzita.

[10] ČERNÁK, M. Plazmová nanomodifikace povrchu materiálů. In: [online]. [cit. 2012-03]. Dostupné z: www2.nanocontact.cz/data/files/streda_22.ppt



- [11] Katedra fyziky (KFY). [online]. [cit. 2012-03]. Dostupné z: <http://www.kfy.zcu.cz/vyzkum/pristroje/ECR.php>
- [12] Laser Physics Department. [online]. [cit. 2012-04]. Dostupné z: <http://www.szfk.hu/index.php?n=10&l=EN>
- [13] Vakuové a plazmochemické techniky povrchových úprav. [online]. [cit. 2012-02]. Dostupné z: <http://www.mmspektrum.com/clanek/vakuove-a-plazmochemicke-techniky-povrchovych-uprav.html>
- [14] KOŠŤÁKOVÁ, E. Technická univerzita v Liberci, Fakulta textilní. [online]. [cit. 2012-04]. Dostupné z: http://www.ft.tul.cz/depart/knt/nanotex/4.prednaska%20TNA_kombinovane%20studium%20LS%20%C5%A1k.rok%202009-10_Eva%20Kostakova,%20KNT,%20FT,%20TUL.pdf
- [15] Fluorace – předúprava povrchů plastových materiálů v automobilovém průmyslu. In: [online]. [cit. 2012-04]. Dostupné z: http://www.infocube.cz/images/plasticproduction/clanky/Fluorace_16-17.pdf
- [16] SIOW, K., L. BRITCHER, S. KAMAR a H.J. GRIESSER. *Plasma methods for generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization. Plasma process and polymers*. 2006, vol. 3, issue 6-7.
- [17] SLÁDKOVÁ, K. *Hmotnostní spektrometrie klastrů a nanomateriálů*. Brno, 2010. Diplomová práce. Masarykova univerzita.
- [18] GRIESSER, H.J. a R.C. CHATELIER. *Surface characterization of plasma polymers from amine, amide and alcohol monomers*. *J. Appl. Polym. Sci.* 1990, vol. 46.
- [19] MORRA, M., E. OCCHIELLO, F. GARBASSI. *Contact-angle hysteresis in oxygen plasma treated poly(tetrafluorethylene)*. *Langmuir* 1989, vol. 5, issue 3



- [20] GOLUB, M.A., T.WYDEYEN, R. D. CORMIA. *Esca study of the effect of hydrocarbon contamination on poly(tetrafluorethylene) exposed to atomic oxygen plasma. Langmuir* 1991, vol. 7, issue 5
- [21] FRIEDRICH, J., G. KUEHN, R. MIX, A. FRITZ, A. SCHOENHALS. *Polymer surface modification with monofunctional groups of variable types and densities. J. Adhes. Sci. Technol.* 2003, vol. 17, No. 12
- [22] VARGO, T.G., E. J. BEKOS, Y. S. KIM, J. P. RANIERI et al. *Synthesis and characterization of fluoropolymeric substrata with immobilized minimal peptide sequences for cell-adhesion studies. 1. J. Biomed. Mater. Res*, 1995, vol. 29, issue 6
- [23] FALLY, F., I. VIRLET, J. RIGA, J. J. VERBIST. *Detailed multitechnique spectroscopic surface and bulk characterization of plasma polymers deposited from 1-propanol, Allyl alcohol and propargyl alcohol. J. Appl. Polym. Sci.*, 1996, vol. 59
- [24] INAGAKI, N., S. TASAKA a K. HIBI. *Surface modification of kapton film by plasma treatments. J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 1992, vol. 30, issue 9
- [25] KO, T.M, J. C. LIN, S. L. COOPER. *Surface charakterization and platelet-adhesion studies of plasma-carboxylated polyethylene. J. Colloid Interface Sci.* 1993, vol. 156, issue 1
- [26] CUEFF, R., G. BAUD, M. BENMALEK, J. P. BESSE, J. R. BUTRUILLE, M. JACQUET. *X-ray photoelectron spectroscopy studies of plasma-modified PET surface and alumina/PET interface. Appl. Surf. Sci.* 1997, vol. 115, issue 3
- [27] DAW, R., T. O'LEARY, J. KELLY, R. D. SHORT et al. *Molecular Engineering of Surfaces by Plasma Copolymerization and Enhanced Cell Attachment and Spreading Plasma Polym*, 1999, vol. 4, No. 2-3



- [28] FRANCE, R.M., R. D. SHORT, R. A. DAWSON, S. MACNEIL. *Attachment of human keratinocytes to plasma co-polymers of acrylic acid octa-1,7-diene and allyl amine octa-1,7-diene* *J. Mater. Chem.*, 1998, vol. 8, issue 1
- [29] HUTTON, S.J, J. M. CROWTHER, J. P. S. BADYAL. *Complexation of fluorosurfactants to functionalized solid surfaces: Smart behavior*. *Chem. Mater.*, 2000, vol. 12, issue 8
- [30] CHATELIER, R.C., X. XIE, T. R. GENGENBACH et al. Effects of plasma modification conditions on surface restructuring. *Langmuir*, 1995, vol. 11, issue 7
- [31] KAVC, T., KERN, W., M. F. EBEL et al., *Surface modification of polyethylene by photochemical introduction of sulfonic acid groups* *Chem. Mater.*, 2000, vol. 12, Issue 4
- [32] MELICHERČÍKOVÁ, Věra. *Sterilizace a dezinfekce ve zdravotnictví*. Vyd. 1. Praha: Grada, 1998, 102 s. ISBN 80-716-9442-8.
- [33] JIRSÁK, O., J. RŮŽIČKOVÁ a D. LUKÁŠ. *NANO '03: Sborník přednášek a posterů*. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2003, 240 s. ISBN 80-214-2527-X.
- [34] RUTLEDGE, G.C. a S.B. WARNER. Electrostatic Spinning and Properties of Ultrafine fibers. In: [online]. [cit. 2012-04]. Dostupné z: <http://www.ntcresearch.org/pdf-rpts/AnRp02/M01-MD22-A2.pdf>
- [35] Technology yflow. [online]. [cit. 2012-04]. Dostupné z: <http://www.yflow.com/?q=node/3>
- [36] KNT - Patenty. [online]. [cit. 2012-03]. Dostupné z: http://www.ft.tul.cz/depart/knt/web/index.php?option=com_content&task=view&id=44&Itemid=44



[37] RŮŽIČKOVÁ, Jana. *Elektrostatické zvlákňování nanovláken*. Vyd. 1. V Liberci: Technická univerzita, 2004, 54 s. ISBN 80-708-3867-1.

[38] Technologie nanospider společnosti Elmarco. In: [online]. [cit. 2012-04]. Dostupné z: http://japtech.zelenausporam.cz/gallery/0/30-5_technologie_nanospider_spolecnosti_elamrco_stanislav_petrik.pdf

[39] PETRÁŠ, D., D. KIMMER, K. SOUKUP a P. KLUSON. Bezpečná nanovlákná. In: [online]. 2009 [cit. 2012-04]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_12_1009-1016.pdf

[40] BŘEZÍKOVÁ, J. *Vývoj scaffoldu na bázi biodegradabilních pěn*. Liberec, 2010. SVOČ. Technická univerzita v Liberci.

[41] STUDNÍČKOVÁ, J. *Anorganická nanovlákná na bázi oxidu křemičitého*. Liberec, 2008. Dizertační práce. Technická univerzita v Liberci.

[42] Applications of TiO₂ nanofibers produced by Nanospider™ technology. [online]. [cit. 2012-04]. Dostupné z: <http://www.elmarco.cz/upload/soubory/dokumenty/82-1-applications-of-tio2-nanofibers-produced-by-nanospider-technology.pdf>

[43] Pardam : Produkty - ZrO₂. [online]. [cit. 2012-04]. Dostupné z: <http://www.pardam.cz/en/products/254/zro-sub-2-sub-zirconium-dioxide->

[44] YANG, D., Y. LI, J. NIE. *Preparation of gelatin/PVAnanofibers and their potential application in controlled release of drugs*. 2007, vol. 69, issue 3, 538

[45] JIN, W., H. J. JEON, J.H. KYM, J.H. Youk. *A study on the preparation of poly(vinyl alcohol) nanofibers containing silver nanoparticles*. 2007, vol. 157, issues 10 – 12, 454

[46] ZIMKOVÁ, L. *Faktory virulence bakterie Escherichia coli izolovaných potravin*. Zlín, 2011. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati.



- [47] VALENTA, T. *Antibiotická rezistence kmenů Escherichia coli a její význam v potravním řetězci*. Zlín, 2011. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati.
- [48] Chemistry worldblog. In: [online]. [cit. 2012-03]. Dostupné z: <http://prospect.rsc.org/blogs/cw/2010/05/10/herbicide-bacteria/>
- [49] DOSTÁLOVÁ, L. *Charakterizace a analýza genomu meticilin-rezistentních kmenů staphylococcus aureus*. Brno, 2010. Diplomová práce. Masarykova univerzita.
- [50] NOVÁKOVÁ, A. *Antibakteriální účinek tavící soli HBS*. Zlín, 2006. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati.
- [51] Microbiology 2009. [online]. [cit. 2012-03]. Dostupné z: <http://microbiology2009.wikispaces.com/Two+Infections+of+the+Upper+Respiratory+System>
- [52] TANUMA, S., C. J. POWELL, D. R. PENN. *Calculations of electron inelastic mean free paths. 5. Data for 14 organic-compounds over the 50-2000 eV range*. *Surf. Interf. Anal.* 1994, vol. 21, issue 3
- [53] NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database [online]. [cit. 2012-05]. Dostupné z: <http://srdata.nist.gov/xps/>
- [54] VASSILEVA, P., V. KRASSTEV, L. LAKOV, O. PESHEV. *XPS determination of the binding energies of phosphorus and nitrogen in phosphazenes*. *J. Mater. Sci.* 2004, vol. 39, issue 9
- [55] HASIK, M., A. BERNASIK, A. DRELINKIEWICZ, K. KOWALSKI, E. WENDA, J. CAMRA. *XPS studies of nitrogen-containing conjugated polymers-palladium systems*. *Surface Sci.* 2002, vol. 507